

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. Juni 2005 (30.06.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/059144 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/77,
9/02, 1/21

(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGE-
SELLSCHAFT; 67056 Ludwigshafen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/014337

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
16. Dezember 2004 (16.12.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 59 660.7 18. Dezember 2003 (18.12.2003) DE

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];
67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KRÖGER, Burkhard
[DE/DE]; Im Waldhof 1, 67117 Limburgerhof (DE).
ZELDER, Oskar [DE/DE]; Franz-Stützel-Str. 8, 67346
Speyer (DE). KLOPPROGGE, Corinna [DE/DE];
Rastatter Str. 10, 68239 Mannheim (DE). SCHRÖDER,
Hartwig [DE/DE]; Benzstr. 4, 69226 Nussloch (DE).
HAEFNER, Stefan [DE/DE]; Luitpoldstrasse 11, 67063
Ludwigshafen (DE).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

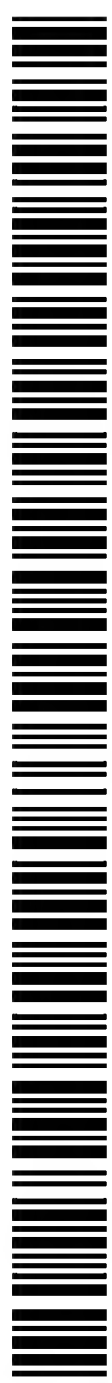
Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: PSOD EXPRESSION UNITS

(54) Bezeichnung: PSOD-EXPRESSIONSEINHEITEN

(57) Abstract: The invention relates to the use of nucleic acid sequences for regulating gene transcription and expression, said novel promoters and expression units, methods for modifying or inducing the gene transcription rate and/or expression rate, expression cassettes containing said expression units, genetically modified microorganisms having a modified or induced transcription rate and/or expression rate, and methods for producing biosynthetic products by cultivating said genetically modified microorganisms.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Nukleinsäuresequenzen zur Regulation der Transkription und Expression von Genen, die neuen Promotoren und Expressionseinheiten selbst, Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen, Expressionskassetten, enthaltend die Expressionseinheiten, genetisch veränderte Mikroorganismen mit veränderter oder verursachter Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate sowie Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung der genetisch veränderten Mikroorganismen.



WO 2005/059144 A1

Psod-Expressionseinheiten

Beschreibung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Nukleinsäuresequenzen zur Regulation der Transkription und Expression von Genen, die neuen Promotoren und Expressionseinheiten selbst, Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen, Expressionskassetten, enthal-
- 10 tend die Expressionseinheiten, genetisch veränderte Mikroorganismen mit veränderter oder verursachter Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate sowie Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung der genetisch veränder-
- ten Mikroorganismen.

- Verschiedene biosynthetische Produkte, wie beispielsweise Feinchemikalien, wie unter
- 15 anderem Aminosäuren, Vitamine aber auch Proteine werden über natürliche Stoffwechselprozesse in Zellen hergestellt und werden in vielen Industriezweigen verwendet, einschließlich der Nahrungsmittel-, Futtermittel-, Kosmetik-, Feed-, Food- und pharmazeutischen Industrie. Diese Substanzen, die zusammen als Feinchemikalien/Proteine bezeichnet werden, umfassen unter anderem organische Säuren, sowohl
- 20 proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Nukleotide und Nukleoside, Lipide und Fettsäuren, Diöle, Kohlenhydrate, aromatische Verbindungen, Vitamine und Cofaktoren, sowie Proteine und Enzyme. Ihre Produktion erfolgt am zweckmäßigsten im Großmaßstab mittels Anzucht von Bakterien, die entwickelt wurden, um große Mengen der jeweils gewünschten Substanz zu produzieren und sezernieren. Für die-
- 25 sen Zweck besonders geeignete Organismen sind coryneforme Bakterien, gram-positive nicht-pathogene Bakterien.

- Es ist bekannt, dass Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum*, hergestellt werden. Wegen der
- 30 großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zum Produkt, beispielsweise durch Ionenaustauschchroma-
- 35 tographie aber auch Sprühtrocknung, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

- Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von Feinchemikalien/Proteine produzierender Stämme von *Corynebacterium* eingesetzt, indem man einzelne Gene amplifiziert und die Auswirkung auf
- 40 die Produktion von Feinchemikalien/Proteine untersucht.

- Andere Wege, um ein Verfahren für die Herstellung Feinchemikalien, Aminosäuren oder Proteine zu entwickeln, oder die Produktivität eines bereits existierenden Verfahrens für die Herstellung Feinchemikalien, Aminosäuren oder Proteine zu erhöhen bzw. zu verbessern, sind die Expression eines oder mehrerer Gene zu erhöhen bzw. zu verändern und oder die Translation einer mRNA durch geeignete Polynukleotidsequenzen zu beeinflussen. Beeinflussung kann in diesem Zusammenhang die Erhöhung, Verringerung, oder auch andere Parameter der Expression von Genen wie zeitliche Expressionsmuster umfassen.
- 10 Dem Fachmann sind unterschiedliche Bestandteile von bakteriellen Regulationssequenzen bekannt. Man unterscheidet die Bindungstellen von Regulatoren, auch Operatoren genannt, die Bindungstellen von RNA-Polymerase-Holoenzymen, auch -35 und -10 Regionen genannt, und die Bindungsstelle von Ribosomaler 16S-RNA, auch Ribosomale Bindungsstelle oder auch Shine-Dalgarno-Sequenz genannt.
- 15 Als Sequenz einer Ribosomalen Bindungsstelle, auch Shine-Dalgarno-Sequenz genannt, im Sinne dieser Erfindung werden Polynukleotidsequenzen verstanden, die sich bis zu 20 Basen stromauf des Initiationskodons der Translation befinden.
- 20 In der Literatur (E. coli und S. typhimurium, Neidhardt F.C. 1995 ASM Press) wird beschrieben, dass sowohl die Zusammensetzung der Polynukleotidsequenz der Shine-Dalgarno-Sequenz, die Sequenzabfolge der Basen, aber auch der Abstand einer in der Shine-Dalgarno-Sequenz enthaltenen Polynukleotidsequenz zum einen wesentlichen Einfluss auf die Initiationsrate der Translation hat.
- 25 Nukleinsäuresequenzen mit Promotoraktivität können die Bildung von mRNA auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Promotoren, deren Aktivität unabhängig von der physiologischen Wachstumsphase des Organismus sind, nennt man konstitutiv. Wiederum andere Promotoren reagieren auf externe chemische, wie physikalische Stimuli wie Sauerstoff, Metabolite, Hitze, pH, etc.. Wiederum andere zeigen in unterschiedlichen Wachstumsphasen eine starke Abhängigkeit ihrer Aktivität. Beispielsweise sind in der Literatur Promotoren beschrieben, die während der exponentiellen Wachstumsphase von Mikroorganismen eine besonders ausgeprägte Aktivität zeigen, oder aber auch genau in der stationären Phase des mikrobiellen Wachstums. Beide Charakteristika von Promotoren können für eine Produktion von Feinchemikalien und Proteine je nach Stoffwechselweg einen günstigen Einfluss auf die Produktivität haben.
- 30
- 35
- 40 Zum Beispiel kann man Promotoren die während des Wachstums die Expression eines Gens ausschalten, diese aber nach einem optimalen Wachstum anschalten dazu nutzen, ein Gen zu regulieren, das die Produktion eines Metaboliten kontrolliert. Der

veränderte Stamm weist dann die gleichen Wachstumsparameter wie der Ausgangsstamm auf, produziert aber mehr Produkt pro Zelle. Diese Art der Modifizierung kann sowohl den Titer (g Produkt/Liter) als auch die C-Ausbeute (g Produkt/g-C-Quelle) erhöhen.

5

In *Corynebacterium* Spezies konnten bereits solche Nukleotidsequenzen isoliert werden, die für eine Erhöhung bzw. eine Abschwächung der Genexpression genutzt werden können. Diese regulierten Promotoren können die Rate, mit der ein Gen transkribiert wird, abhängig von den internen und/oder externen Bedingungen der Zelle erhöhen oder erniedrigen. Zum Teil kann die Anwesenheit eines bestimmten Faktors, bekannt als Inducer, die Rate der Transkription vom Promotor stimulieren. Inducer können direkt oder aber indirekt die Transkription vom Promotor beeinflussen. Eine andere Klasse von Faktoren, bekannt als Suppressoren ist in der Lage, die Transkription vom Promotor zu reduzieren oder aber zu inhibieren. Wie auch die Inducer, können auch die Suppressoren direkt oder indirekt wirken. Es sind jedoch auch Promotoren bekannt, die über die Temperatur reguliert werden. So kann der Level der Transkription solcher Promotoren zum Beispiel durch eine Erhöhung der Wachstumstemperatur über die normale Wachstumstemperatur der Zelle erhöht oder aber abgeschwächt werden.

20 Eine geringe Anzahl von Promotoren aus *C. glutamicum* wurden bis zum heutigen Tag beschrieben. Der Promotor des Malatsynthase-Gens aus *C. glutamicum* wurde im DE 4440118 beschrieben. Dieser Promotor wurde einem für ein Protein kodierendes Strukturgen vorgeschaltet. Nach Transformation eines solchen Konstrukts in ein coryneform-
25 Bakterium wird die Expression des dem Promotor nachgeschalteten Strukturgen reguliert. Die Expression des Strukturgens wird induziert sobald dem Medium ein entsprechender Induktor zugesetzt wird.

Reinscheid et al., Microbiology 145:503 (1999) haben eine transkriptionelle Fusion zwischen dem pta-ack Promotor aus *C. glutamicum* und einem Reportergen (Chloramphenicol Acetyltransferase) beschrieben. Zellen von *C. glutamicum*, die eine solche transkriptionelle Fusion enthalten, wiesen eine erhöhte Expression des Reportergenes bei Wachstum auf Acetat haltigem Medium auf. Im Vergleich dazu zeigten transformierte Zellen, die auf Glucose wuchsen, keine erhöhte Expression dieses Reportergens.

35

In Pa'tek et al., Microbiology 142:1297 (1996) wurden einige DNA Sequenzen aus *C. glutamicum* beschrieben, die die Expression eines Reportergens in *C. glutamicum* Zellen verstärken können, beschrieben. Diese Sequenzen wurden miteinander verglichen, um Consensus-Sequenzen für *C. glutamicum* Promotoren zu definieren.

40

Weitere DNA-Sequenzen aus *C. glutamicum*, die zur Regulation der Genexpression genutzt werden können, sind im Patent WO 02/40679 beschrieben worden. Diese isolierten Polynukleotide stellen Expressionseinheiten aus *Corynebakterium glutamicum* dar, die entweder zur Erhöhung oder aber zur Verringerung einer Genexpression genutzt werden können. Weiterhin sind in diesem Patent rekombinante Plasmide beschrieben, auf denen die Expressionseinheiten aus *Corynebakterium glutamicum* mit heterologen Genen assoziiert sind. Die hier beschriebene Methode, Fusion von einem Promotor aus *Corynebakterium glutamicum* mit einem heterologen Gen, kann unter anderem zur Regulation der Gene der Aminosäurebiosynthese eingesetzt werden.

Der Erfindung lag die Aufgabe zugrunde weitere Promotoren und/oder Expressionseinheiten mit vorteilhaften Eigenschaften zur Verfügung zu stellen.

Demgemäß wurde gefunden, dass man Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, enthaltend

A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder

B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist oder

C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder

D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C)

zur Transkription von Genen verwenden kann.

Unter „Transkription“ wird erfindungsgemäß der Prozess verstanden, durch den ausgehend von einer DNA-Matrize ein komplementäres RNA-Molekül hergestellt wird. An diesem Prozess sind Proteine wie die RNA-Polymerase sogenannte Sigma-Faktoren und transkriptionelle Regulatorproteine beteiligt. Die synthetisierte RNA dient dann als Matrize im Prozess der Translation, der dann zum biosynthetisch aktiven Protein führt.

Die Bildungsrate, mit der ein biosynthetisch aktives Protein hergestellt wird, ist ein Produkt aus der Rate der Transkription und der Translation. Beide Raten können erfindungsgemäß beeinflusst werden und damit die Rate der Bildung von Produkten in einem Mikroorganismus beeinflussen.

Unter einem „Promotor“ oder einer „Nukleinsäure mit Promotoraktivität“ wird erfindungsgemäß eine Nukleinsäure verstanden, die in funktioneller Verknüpfung mit einer zu transkribierenden Nukleinsäure, die Transkription dieser Nukleinsäure reguliert.

- 5 Unter einer „funktionellen Verknüpfung“ versteht man in diesem Zusammenhang beispielsweise die sequentielle Anordnung einer der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und einer zu transkribierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel Nukleinsäuresequenzen, die die Transkription von Nukleinsäuren gewährleisten, sowie zum Beispiel einen Terminator
- 10 derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Transkription der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevor-
- 15 zugt sind Anordnungen, in denen die zu transkribierende Nukleinsäuresequenz hinter (d.h. am 3'-Ende) der erfindungsgemäßen Promotorsequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als
- 20 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

Unter „Promotoraktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch den Promotor gebildete Menge RNA, also die Transkriptionsrate verstanden.

- 25 Unter „spezifischer Promotoraktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch den Promotor gebildete Menge RNA pro Promotor verstanden.

Unter dem Begriff „Wildtyp“ wird erfindungsgemäß der entsprechende Ausgangsmikroorganismus verstanden.

- 30 Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff „Mikroorganismus“ der Ausgangsmikroorganismus (Wildtyp) oder ein erfindungsgemäßer, genetisch veränderter Mikroorganismus oder beides verstanden werden.

- 35 Vorzugsweise und insbesondere in Fällen, in denen der Mikroorganismus oder der Wildtyp nicht eindeutig zugeordnet werden kann, wird unter „Wildtyp“ für die Veränderung oder Verursachung der Promotoraktivität oder Transkriptionsrate, für die Veränderung oder Verursachung der Expressionsaktivität oder Expressionsrate und für die Erhöhung des Gehalts an biosynthetischen Produkten jeweils ein Referenzorganismus

verstanden.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist dieser Referenzorganismus *Corynebakterium glutamicum* ATCC 13032.

5

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Ausgangsmikroorganismen verwendet die bereits in der Lage sind, die gewünschte Feinchemikalie herzustellen. Besonders bevorzugt sind dabei unter den besonders bevorzugten Mikroorganismen der Bakterien der Gattung *Corynebacterien* und den besonders bevorzugten Feinchemikalien L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin, diejenigen Ausgangsmikroorganismen die bereits in der Lage sind, L-Lysin, L-Methionin und/oder L-Threonin herzustellen. Dies sind besonders bevorzugt *Corynebakterien* bei denen beispielsweise das Gen kodierend für eine Aspartokinase (ask-Gen) dereguliert ist oder die feed-back-Inhibierung aufgehoben oder reduziert ist. Beispielsweise weisen solche Bakterien im ask-Gen eine Mutation auf, die zu einer Reduzierung oder Aufhebung der feed-back-Inhibierung führen, wie beispielsweise die Mutation T311I.

10

15

20

Bei einer „verursachten Promotoraktivität“ oder Transkriptionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp die Bildung einer RNA verursacht, die im Wildtyp so nicht vorhanden war.

25

Bei einer veränderten Promotoraktivität oder Transkriptionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit die gebildete Menge der RNA verändert.

Unter „verändert“ wird in diesem Zusammenhang bevorzugt erhöht oder erniedrigt verstanden.

30

Dies kann beispielsweise durch Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Promotoraktivität des endogenen erfindungsgemäßen Promotors, beispielsweise durch Mutation des Promotors oder durch Stimulierung oder Hemmung des Promotors erfolgen.

35

Weiterhin kann die erhöhte Promotoraktivität oder Transkriptionsrate beispielsweise durch Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität erreicht werden, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

40

Vorzugsweise wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäu-

ren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität dadurch erreicht, dass man

5 eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

10 ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

15 ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität enthalten

20 A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist
oder
25 C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C)

30 Die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 stellt die Promotorsequenz der Superoxid-Dismutase (Psod) aus *Corynebakterium glutamicum* dar. SEQ. ID. NO. 1 entspricht der Promotorsequenz des Wildtyps.

Die Erfindung betrifft weiterhin Nukleinsäuren mit Promotoraktivität enthaltend eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete

35 Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist.

Weitere natürliche erfindungsgemäße Beispiele für erfindungsgemäße Promotoren lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Nukleinsäuresequenzen aus Daten-

40

banken mit der vorstehend beschriebenen Sequenzen SEQ ID NO: 1 leicht auffinden.

Künstliche erfindungsgemäße Promotor-Sequenzen lassen sich ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 1 durch künstliche Variation und Mutation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden leicht auffinden.

Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Nukleotide durch ein oder mehrere Nukleotide zu verstehen. „Deletion“ ist das Ersetzen eines Nukleotides durch eine direkte Bindung. Insertionen sind Einfügungen von Nukleotiden in die Nukleinsäuresequenz, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Nukleotide ersetzt wird.

Unter Identität zwischen zwei Nukleinsäuren wird die Identität der Nukleotide über die jeweils gesamte Nukleinsäurelänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Vector NTI Suite 7.1 Software der Firma Informax (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

- 20 Multiple alignment parameter:
 - Gap opening penalty 10
 - Gap extension penalty 10
 - Gap separation penalty range 8
 - Gap separation penalty off
- 25 % identity for alignment delay 40
 - Residue specific gaps off
 - Hydrophilic residue gap off
 - Transition weighing 0
- 30 Pairwise alignment parameter:
 - FAST algorithm on
 - K-tuplesize 1
 - Gap penalty 3
 - Window size 5
- 35 Number of best diagonals 5

Unter einer Nukleinsäuresequenz, die eine Identität von mindestens 90 % mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweist, wird dementsprechend eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 1, ins-

besondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 90 % aufweist.

- 5 Besonders bevorzugte Promotoren weisen mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 eine Identität von 91%, bevorzugter 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, besonders bevorzugt 99% auf.

- 10 Weitere natürliche Beispiele für Promotoren lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 1 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- 15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. No. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Diese Nukleinsäuresequenz umfasst mindestens 10, bevorzugter mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevorzugt mehr als 150 Nukleotide.

- 20 Die Hybridisierung erfolgt erfindungsgemäß unter stringenten Bedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben:

- 25 Unter stringenten Hybridisierungs-Bedingungen werden insbesondere verstanden: Die über Nacht Inkubation bei 42°C in einer Lösung bestehend aus 50 % Formamid, 5 x SSC (750 mM NaCl, 75 mM Tri-Natrium Citrat), 50 mM Natrium Phosphat (pH 7,6), 5x Denhardt Lösung, 10% Dextransulfat und 20 g/ml denaturierte, gescheerte Lachsspermien-DNA, gefolgt von einem Waschen der Filter mit 0,1x SSC bei 65°C.
- 30

- Unter einem „funktionell äquivalenten Fragment“ werden für Nukleinsäuresequenzen mit Promotoraktivität, Fragmente verstanden die im wesentlichen die gleiche oder eine höhere spezifische Promotoraktivität aufweisen wie die Ausgangssequenz.

- 35 Unter „im wesentlichen gleich“ wird eine spezifische Promotoraktivität verstanden die mindestens 50%, vorzugsweise 60%, bevorzugter 70%, bevorzugter 80%, bevorzugter 90%, besonders bevorzugt 95% der spezifischen Promotoraktivität der Ausgangssequenz aufweist.

Unter „Fragmente“ werden Teilsequenzen der durch Ausführungsform A), B) oder C) beschriebenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität verstanden. Vorzugweise weisen diese Fragmente mehr als 10, bevorzugter aber mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevorzugts mehr als 150 zusammenhängende Nukleotide der Nukleinsäuresequenz
5 SEQ. ID. NO. 1 auf.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 als Promotor, d.h. zur Transkription von Genen.

10 Die SEQ. ID. NO. 1 ist ohne Funktionszuordnung im Genbank-Eintrag AP005283 beschrieben worden. Daher betrifft die Erfindung ferner die neuen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen mit Promotoraktivität.

Insbesondere betrifft die Erfindung eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität, enthaltend
15

- A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
- B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist
20 oder
- C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C),

25 mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 ausgenommen ist.

Alle vorstehend erwähnten Nukleinsäuren mit Promotoraktivität sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie
30 beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory
35 manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung einer Expressionseinheit, enthaltend eine
40 der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und zusätzlich funktionell

verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet, zur Expression von Genen.

5 Unter einer Expressionseinheit wird erfindungsgemäß eine Nukleinsäure mit Expressionsaktivität verstanden, also eine Nukleinsäure verstanden, die in funktioneller Verknüpfung mit einer zu exprimierenden Nukleinsäure oder Gens, die Expression, also die Transkription und die Translation dieser Nukleinsäure oder dieses Gens reguliert.

10 Unter einer „funktionellen Verknüpfung“ versteht man in diesem Zusammenhang beispielsweise die sequentielle Anordnung einer der erfindungsgemäßen Expressionseinheit und einer transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne
15 erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter (d.h. am 3'-Ende) der erfindungsgemäßen Expressionseinheitssequenz positioniert wird, so dass beide
20 Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Expressionseinheitssequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

25 Unter „Expressionsaktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch die Expressionseinheit gebildete Menge Protein, also die Expressionsrate verstanden.

Unter „spezifischer Expressionsaktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch die Expressionseinheit gebildete Menge Protein pro Expressionseinheit ver-
30 standen.

Bei einer „verursachten Expressionsaktivität“ oder Expressionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp die Bildung eines Proteins verursacht, das im Wildtyp so nicht vorhanden war.

35 Bei einer „veränderten Expressionsaktivität“ oder Expressionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit die gebildete Menge des Proteins verändert.

Unter „verändert“ wird in diesem Zusammenhang bevorzugt erhöht oder erniedrigt verstanden.

5 Dies kann beispielsweise durch Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Aktivität der endogenen Expressionseinheit, beispielsweise durch Mutation der Expressionseinheit oder durch Stimulierung oder Hemmung der Expressionseinheit erfolgen.

10 Weiterhin kann die erhöhte Expressionsaktivität oder Expressionsrate beispielsweise durch Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch Expressionseinheiten mit Erhöhter spezifischer Expressionsaktivität erreicht werden, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

15 Vorzugsweise wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit Erhöhter spezifischer Expressionsaktivität dadurch erreicht, dass man

20 eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

25 ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

30 ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

35 Die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, enthalten eine erfindungsgemäße, vorstehend beschriebene Nukleinsäure mit Promotoraktivität und zusätzlich funktionell verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet.

Vorzugsweise enthält diese Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet, die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 42 als ribosomale Bindungsstelle.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Expressionseinheit:

- 10 E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
- F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder
- G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G).

15

Die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 stellt die Nukleinsäuresequenz der Expressionseinheit der Superoxid-Dismutase (Psod) aus *Corynebakterium glutamicum* dar. SEQ. ID. NO. 2 entspricht der Sequenz der Expressionseinheit des Wildtyps.

20 Die Erfindung betrifft weiterhin Expressionseinheiten, enthaltend eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

25 Weitere natürliche erfindungsgemäße Beispiele für erfindungsgemäße Expressionseinheiten lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der vorstehend beschriebenen Sequenzen SEQ ID NO: 2 leicht auffinden.

30

Künstliche erfindungsgemäße Sequenzen der Expressionseinheiten lassen sich ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 durch künstliche Variation und Mutation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden leicht auffinden.

35

Unter einer Nukleinsäuresequenz, die eine Identität von mindestens 90 % mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, wird dementsprechend eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität

40 von mindestens 90 % aufweist.

Besonders bevorzugte Expressionseinheiten weisen mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 eine Identität von 91%, bevorzugter 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, besonders bevorzugt 99% auf.

5

Weitere natürliche Beispiele für Expressionseinheiten lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

10

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher Expressionseinheiten, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. No. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Diese Nukleinsäuresequenz umfasst mindestens

15

10, bevorzugter mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevorzugt mehr als 150 Nukleotide.

Unter "hybridisieren" versteht man die Fähigkeit eines Poly- oder Oligonukleotids unter stringenten Bedingungen an eine nahezu komplementäre Sequenz zu binden, während

20

25

unter diesen Bedingungen unspezifische Bindungen zwischen nicht-komplementären Partnern unterbleiben. Dazu sollten die Sequenzen vorzugsweise zu 90-100%, komplementär sein. Die Eigenschaft komplementärer Sequenzen, spezifisch aneinander binden zu können, macht man sich beispielsweise in der Northern- oder Southern-Blot-Technik oder bei der Primerbindung in PCR oder RT-PCR zunutze.

30

Die Hybridisierung erfolgt erfindungsgemäß unter stringenten Bedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben:

35

Unter stringenten Hybridisierungs-Bedingungen werden insbesondere verstanden: Die über Nacht Inkubation bei 42°C in einer Lösung bestehend aus 50 % Formamid, 5 x SSC (750 mM NaCl, 75 mM Tri-Natrium Citrat), 50 mM Natrium Phosphat (pH 7,6), 5x Denhardt Lösung, 10% Dextransulfat und 20 g/ml denaturierte, gescheerte Lachsspermien-DNA, gefolgt von einem Waschen der Filter mit 0,1x SSC bei 65°C.

40

Die erfindungsgemäß Nukleotidsequenzen ermöglichen ferner die Erzeugung von Sonden und Primern, die zur Identifizierung und/oder Klonierung von homologer Sequenzen in anderen Zelltypen und Mikroorganismen verwendbar sind. Solche Sonden

bzw. Primer umfassen gewöhnlich einen Nukleotidsequenzbereich, der unter stringen-
ten Bedingungen an mindestens etwa 12, vorzugsweise mindestens etwa 25, wie z.B.
etwa 40, 50 oder 75 aufeinanderfolgende Nukleotide eines Sense-Stranges einer erfin-
dungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder eines entsprechenden Antisense-Stranges
5 hybridisiert.

Erfindungsgemäß umfasst sind auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte
stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eines speziellen
Ursprungs- oder Wirtsorganismus, im Vergleich zu einer konkret genannten Sequenz
10 verändert sind, ebenso wie natürlich vorkommende Varianten, wie z.B. Spleißvarianten
oder Allelvarianten, davon.

Unter einem „funktionell äquivalenten Fragment“ werden für Expressionseinheiten,
Fragmente verstanden die im wesentlichen die gleiche oder eine höhere spezifische
15 Expressionsaktivität aufweisen wie die Ausgangssequenz.

Unter „im wesentlichen gleich“ wird eine spezifische Expressionsaktivität verstanden
die mindestens 50%, vorzugsweise 60%, bevorzugter 70%, bevorzugter 80%, bevor-
zugter 90%, besonders bevorzugt 95% der spezifischen Expressionsaktivität der Aus-
gangssequenz aufweist.
20

Unter „Fragmente“ werden Teilsequenzen der durch Ausführungsform E), F) oder G)
beschriebenen Expressionseinheiten verstanden. Vorzugweise weisen diese Frag-
mente mehr als 10, bevorzugter aber mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevor-
zugt mehr als 150 zusammenhängende Nukleotide der Nukleinsäuresequenz SEQ.
25 ID. NO. 1 auf.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 als
Expressionseinheit, d.h. zur Expression von Genen.
30

Die SEQ. ID. NO. 2 ist ohne Funktionszuordnung im Genbank-Eintrag AP005283 be-
schrieben worden. Daher betrifft die Erfindung ferner die neuen, erfindungsgemäßen
Expressionseinheiten.

35 Insbesondere betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, enthaltend eine erfin-
dungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität zusätzlich funktionell verknüpft eine
Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet.

Besonders bevorzugt betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, enthaltend
40

- E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder
5 G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G),

10 mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 ausgenommen ist.

Die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten umfassen ein oder mehrere der folgenden genetischen Elemente: eine Minus 10 (" -10") Sequenz; eine Minus 35 (" -35") Sequenz; einen Transkriptionsstart, eine Enhancer Region; und eine Operator Region.

15 Vorzugsweise sind diese genetischen Elemente spezifisch für die Spezies Corynebakterien, speziell für *Corynebacterium glutamicum*.

Alle vorstehend erwähnten Expressionseinheiten sind weiterhin in an sich bekannter
20 Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der
25 DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

30 Für die Erfindungen in diesem Patent wurden Methoden und Techniken genutzt, die dem Fachmann, der in mikrobiologischen und rekombinanten DNA-Techniken geübt ist, bekannt sind. Methoden und Techniken für das Wachstum von Bakterienzellen, das Einschleusen von isolierten DNA-Molekülen in die Wirtszelle, und die Isolierung, Klonierung und Sequenzierung von isolierten Nukleinsäuremolekülen usw. sind Beispiele
35 für solche Techniken und Methoden. Diese Methoden sind in vielen Standardliteraturstellen beschrieben: Davis et al., Basic Methods In Molecular Biology (1986); J. H. Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1972); J.H. Miller, A Short Course in Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1992); M. Singer
40 and P. Berg, Genes & Genomes, University Science Books, Mill Valley, California

(1991); J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); P.B. Kaufmann et al., Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine, CRC Press, Boca Raton, Florida (1995); Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, B.R. Glick and J.E. Thompson, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida (1993); and P.F. Smith-Keary, Molecular Genetics of Escherichia coli, The Guilford Press, New York, NY (1989).

Alle Nukleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung liegen bevorzugt in Form eines isolierten Nukleinsäuremoleküls vor. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure zugegen sind und kann überdies im wesentlichen frei von anderem zellulärem Material oder Kulturmedium sein, wenn es durch rekombinante Techniken hergestellt wird, oder frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien sein, wenn es chemisch synthetisiert wird.

Die Erfindung umfasst weiterhin die zu den konkret beschriebenen Nukleotidsequenzen komplementären Nukleinsäuremoleküle oder einen Abschnitt davon.

Die erfindungsgemäßen Promotoren und/oder Expressionseinheiten lassen sich beispielsweise besonders vorteilhaft in verbesserten Verfahren zur fermentativen Herstellung von biosynthetischen Produkten wie nachstehend beschrieben verwenden.

Die erfindungsgemäßen Promotoren und/oder Expressionseinheiten weisen insbesondere den Vorteil auf, dass sie in Mikroorganismen durch Stress induziert werden. Durch geeignete Steuerung des Fermentationsprozesses lässt sich diese Stress-Induktion gezielt für eine Erhöhung der Transkriptions/Expressionsrate gewünschter Gene steuern. Insbesondere bei der Produktion von L-Lysin wird diese Stressphase sehr früh erreicht, so dass hier sehr früh eine erhöhte Transkriptions/Expressionsrate von gewünschten Genen erreicht werden kann.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität können zur Veränderung, also zur Erhöhung oder Reduzierung, oder zur Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp verwendet werden.

Die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten können zur Veränderung, also zur Erhöhung oder Reduzierung, oder zur Verursachung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp verwendet werden.

Ferner können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten zur Regulation und Verstärkung der Bildung von verschiedenen biosynthetischen Produkten, wie beispielsweise Feinchemikalien, Proteinen, insbesondere Aminosäuren, in Mikroorganismen, insbesondere in *Corynebacterium species* dienen.

Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch

- 10 a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp oder
- 15 b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

Gemäß Ausführungsform a) kann die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass im Mikroorganismus die spezifische Promotoraktivität verändert, also erhöht oder erniedrigt wird. Dies kann beispielsweise durch gezielte Mutation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz mit Promotoraktivität, also durch gezielte Substitution, Deletion oder Insertion von Nukleotiden erfolgen. Eine erhöhte bzw. erniedrigte Promotoraktivität kann dadurch erreicht werden, dass Nukleotide in der Bindungsstelle des RNA-Polymerase-Holoenzym-Bindungsstellen (dem Fachmann auch als –10-Region und –35 Region bekannt) ausgetauscht werden. Weiterhin dadurch dass der Abstand der beschriebenen RNA-Polymerase-Holoenzym-Bindungsstellen zueinander durch Deletionen von Nukleotiden oder Insertionen von Nukleotiden verkleinert oder vergrößert werden. Weiterhin dadurch dass Bindungsstellen (dem Fachmann auch als –Operatoren bekannt) für Regulationsproteine (dem Fachmann bekannt als Repressoren und Aktivatoren) in räumliche Nähe an die Bindungsstellen des RNA-Polymerase-Holoenzym gebracht werden, dass diese Regulatoren nach Bindung an eine Promotor-Sequenz die Bindung des und Transkriptionsaktivität des RNA-Polymerase-Holoenzym abschwächen oder verstärken, oder auch unter einen neuen regulatorischen Einfluss stellen.

Die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44 stellt vorzugsweise die ribosomale Bindungsstelle der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, die Sequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43 die –10-Region der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten dar.

Veränderungen der Nukleinsäuresequenz in diesen Regionen führen zu einer Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität.

Die Erfindung betrifft daher die Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44 als ribosomale Bindungsstelle in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.

Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung der Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43 als -10-Region in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.

Insbesondere betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44. Vorzugsweise wird dabei die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44. als ribosomale Bindungsstelle verwendet.

Weiterhin betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend mindestens eine der Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43. Vorzugsweise wird dabei eine der Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43 als -10-Region verwendet.

In Bezug auf die „spezifische Promotoraktivität“ wird unter Erhöhung oder Reduzierung im Vergleich zum Wildtyp eine Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Aktivität gegenüber der erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit Promotoraktivität des Wildtyps, also beispielsweise gegenüber der SEQ. ID. NO. 1 verstanden.

Gemäß Ausführungsform b) kann die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass man die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass man

b1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promo-

toraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

5 b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

10 b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

15 Es ist somit möglich, die Transkriptionsrate eines endogenen Gens des Wildtyps zu verändern, also zu erhöhen oder zu erniedrigen indem man

20 gemäß Ausführungsform b1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

25 gemäß Ausführungsform b2) ein oder mehrere endogene Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten, endogenen Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

30 Gemäß Ausführungsform b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende endogene Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

35 Ferner ist es somit möglich, die Transkriptionsrate eines exogenen Gens im Vergleich zum Wildtyps zu verursachen, indem man

40 gemäß Ausführungsform b2) ein oder mehrere exogene Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten, exogenen Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Pro-

motoraktivität, erfolgt oder

5 Gemäß Ausführungsform b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende exogene Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

10 Die Insertion von Genen gemäß Ausführungsform b2) kann dabei so erfolgen, dass das Gen in kodierende Bereiche oder nicht-kodierende Bereiche integriert wird. Vorzugsweise erfolgt die Insertion in nicht-kodierende Bereiche.

15 Die Insertion von Nukleinsäurekonstrukten gemäß Ausführungsform b3) kann dabei chromosomal oder extrachromosomal erfolgen. Vorzugsweise erfolgt die Insertion der Nukleinsäurekonstrukte chromosomal. Eine „chromosomale“ Integration ist die Insertion eines exogenen DNA-Fragmentes in das Chromosom einer Wirtszelle. Dieser Begriff wird auch für die homologe Rekombination zwischen einem exogenen DNA-Fragment und der entsprechenden Region auf dem Chromosom der Wirtszelle genutzt.

20 In Ausführungsform b) werden bevorzugt auch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) eingesetzt. Diese können in Ausführungsform b), wie in Ausführungsform a) beschrieben im Mikroorganismus vorliegen und hergestellt werden oder in isolierter Form in den Mikroorganismus eingebracht werden.

25 Unter „endogen“ werden genetische Informationen, wie beispielsweise Gene, verstanden, die bereits im Wildtypgenom enthalten sind.

30 Unter „exogen“ werden genetische Informationen, wie beispielsweise Gene, verstanden, die im Wildtypgenom nicht enthalten sind.

Unter dem Begriff „Gene“ in Bezug auf Regulation der Transkription durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität werden vorzugsweise Nukleinsäuren verstanden, die einen zu transkribierenden Bereich, also beispielsweise einen Bereich der die Translation reguliert, einen kodierenden Bereich, sowie gegebenenfalls
35 weitere Regulationselemente, wie beispielsweise einen Terminator, enthalten.

Unter dem Begriff „Gene“ in Bezug auf die nachstehend beschriebene Regulation der Expression durch die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten werden vorzugsweise Nukleinsäuren verstanden, die einen kodierenden Bereich, sowie gegebenenfalls wei-

tere Regulationselemente, wie beispielsweise einen Terminator, enthalten.

Unter einem „kodierenden Bereich“ wird eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die ein Protein kodiert.

5

Unter „heterolog“ in Bezug auf Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und Gene wird verstanden, dass die verwendeten Gene im Wildtyp nicht unter Regulation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität transkribiert werden, sondern dass eine neue, im Wildtyp nicht vorkommende funktionelle Verknüpfung entsteht und die funktionelle Kombination aus erfindungsgemäßer Nukleinsäure mit Promotoraktivität und spezifisches Gen im Wildtyp nicht vorkommt.

10

Unter „heterolog“ in Bezug auf Expressionseinheiten und Gene wird verstanden, dass die verwendeten Gene im Wildtyp nicht unter Regulation der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten exprimiert werden, sondern dass eine neue, im Wildtyp nicht vorkommende funktionelle Verknüpfung entsteht und die funktionelle Kombination aus erfindungsgemäßer Expressionseinheit und spezifisches Gen im Wildtyp nicht vorkommt.

15

Die Erfindung betrifft ferner in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zur Erhöhung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp indem man

20

ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von erfindungsgemäßen endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

25

bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

30

Vorzugsweise wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform ah) dadurch erreicht wird, dass man

35

bh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer en-

40

dogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

- 5 bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 10 bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 15 Die Erfindung betrifft ferner in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zur Reduzierung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp, indem man
- 20 ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, die die Transkription der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder
- 25 br) Nukleinsäuren mit reduzierter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription endogene Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.
- 30 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch
- 35 c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp oder
- d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

Gemäß Ausführungsform c) kann die Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass im Mikroorganismus die spezifische Expressionsaktivität verändert, also erhöht oder erniedrigt wird. Dies kann beispielsweise durch gezielte Mutation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz mit Promotoraktivität, also durch gezielte Substitution, Deletion oder Insertion von Nukleotiden erfolgen. Beispielsweise führt die Verlängerung des Abstandes zwischen Shine-Dalgarno-Sequenz und dem translationellen Startcodon in der Regel zu einer Änderung, einer Verkleinerung oder aber auch einer Verstärkung der spezifischen Expressionsaktivität. Eine Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität kann auch dadurch erreicht werden, dass die Sequenz der Shine-Dalgarno-Region (Ribosomale Bindungsstelle) in seinem Abstand zum translationellen Startcodon durch Deletionen oder Insertionen von Nukleotiden entweder verkürzt oder verlängert wird. Aber auch dadurch dass die Sequenz der Shine-Dalgarno-Region so verändert wird, dass die Homologie zu komplementären 3' Seite 16S rRNA entweder verstärkt oder aber auch verringert wird.

In Bezug auf die „spezifische Expressionsaktivität“ wird unter Erhöhung oder Reduzierung im Vergleich zum Wildtyp eine Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Aktivität gegenüber der erfindungsgemäßen Expressionseinheit des Wildtyps, also beispielsweise gegenüber der SEQ. ID. NO. 2 verstanden.

Gemäß Ausführungsform d) kann die Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass man die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass man

d1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten erfolgt oder

d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

5

Es ist somit möglich, die Expressionsrate eines endogenen Gens des Wildtyps zu verändern, also zu erhöhen oder zu erniedrigen indem man

gemäß Ausführungsform d1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten erfolgt oder

10

gemäß Ausführungsform d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

15

gemäß Ausführungsform d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

20

Ferner ist es somit möglich, die Expressionssrate eines exogenen Gens im Vergleich zum Wildtyps zu verursachen, indem man

25

gemäß Ausführungsform d2) ein oder mehrere exogene Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

30

gemäß Ausführungsform d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende, exogene Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

35

Die Insertion von Genen gemäß Ausführungsform d2) kann dabei so erfolgen, dass das Gen in kodierende Bereiche oder nicht-kodierende Bereiche integriert wird. Vorzugsweise erfolgt die Insertion in nicht-kodierende Bereiche.

40

Die Insertion von Nukleinsäurekonstrukten gemäß Ausführungsform d3) kann dabei chromosomal oder extrachromosomal erfolgen. Vorzugsweise erfolgt die Insertion der Nukleinsäurekonstrukte chromosomal.

- 5 Die Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch als Expressionskassetten bezeichnet.

- 10 In Ausführungsform d) werden bevorzugt auch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) eingesetzt. Diese können in Ausführungsform d), wie in Ausführungsform d) beschrieben im Mikroorganismus vorliegen und hergestellt werden oder in isolierter Form in den Mikroorganismus eingebracht werden.

- 15 Die Erfindung betrifft ferner in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zur Erhöhung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp indem man

- 20 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

- 25 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

- 30 Vorzugsweise wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) dadurch erreicht, dass man

- 35 dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

- 40 dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenen-

falls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

- dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Reduzierung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp, indem man

- cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder

- dr) Expressionseinheiten mit reduzierter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform cr) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.

- In einer bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen sind die Gene ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von Feinchemikalien, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen sind die Gene ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gege-

benenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

In einer besondere bevorzugten Ausführungsform sind die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt aus der Gruppe

- 5
- Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthase I, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin
- 10
- Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase.
- 15
- 20
- 25

Bevorzugte Proteine und Nukleinsäuren kodierend diese Proteine der vorstehend beschriebenen Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren sind Proteinsequenzen bzw. Nukleinsäuresequenzen mikrobiellen Ursprungs, vorzugsweise aus Bakterien der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium, bevorzugt aus coryneformen Bakterien, besonders bevorzugt aus Corynebacterium glutamicum.

Beispiele für besonders bevorzugte Proteinsequenzen und die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen kodierend diese Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, deren Bezugsdokument, sowie deren Bezeichnung im Bezugsdokument sind in Tabelle 1 aufgelistet:

Tabelle 1

Protein	Nukleinsäure kodierend	Bezugs- dokument	SEQ. ID. NO. im Bezugsdoku-
---------	---------------------------	---------------------	--------------------------------

	Protein		ment
Aspartatkinase	ask oder lysC	EP1108790	DNA: 281 Protein: 3781
Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase	asd	EP1108790	DNA: 331 Protein: 3831
Dihydrodipicolinate-Synthetase	dapA	WO 0100843	DNA: 55 Protein: 56
Dihydrodipicolinate-Reduktase	dapB	WO 0100843	DNA: 35 Protein: 36
Meso-Diaminopimelat-D-Dehydrogenase	ddh	EP1108790	DNA : 3494 Protein : 6944
Diaminopicolinat-Decarboxylase	lysA	EP1108790	DNA: 3451 Prot.:6951
Lysin-Exporter	lysE	EP1108790	DNA: 3455 Prot.: 6955
Arginyl-t-RNA Synthetase	argS	EP1108790	DNA: 3450 Prot.: 6950
Glucose-6-Phosphat-Dehydrognease	zwf	WO 0100844	DNA: 243 Prot.: 244
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	gap	WO 0100844	DNA: 187 Prot.: 188
3-Phosphoglycerat-kinase	pgk	WO 0100844	DNA: 69 Prot.: 70
Pyruvat-Carboxylase	pycA	EP1108790	DNA: 765 Prot.: 4265
Triosephosphat-Isomerase	tpi	WO 0100844	DNA: 61 Prot.: 62
Biotin-Ligase	birA	EP1108790	DNA: 786 Prot.: 4286
PEP-Carboxylase	pck	EP1108790	DNA: 3470 Prot.: 6970
Homoserin Kinase	thrB	WO 0100843	DNA: 173 Prot.: 174
Threonin Synthase	thrC	WO 0100843	DNA: 175 Prot.: 176
Threonin Export Carrier	thrE	WO 0251231	DNA: 41

			Prot.: 42
Threonin Efflux Protein	RXA2390	WO 0100843	DNA: 7 Prot.: 8
Threonin Dehydratase	ilvA	EP 1108790	DNA: 2328 Prot.: 5828
Homoserin-O-Acetyltransferase	metA	EP 1108790	DNA: 727 Prot.: 4227
Cystathionin-gamma-synthase	metB	EP 1108790	DNA: 3491 Prot.: 6991
Cystathionin-beta-Lyase	metC	EP 1108790	DNA: 2535 Prot.: 6035
Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, -	methH	EP 1108790	DNA: 1663 Prot.: 5163
O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase	metY	EP 1108790	DNA: 726 Prot.: 4226
Methylentetrahydro-folat-Reduktase	metF	EP 1108790	DNA: 2379 Prot.: 5879
D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase	serA	EP 1108790	DNA: 1415 Prot.: 4915
Phosphoserin-Phosphatase 1	serB	WO 0100843	DNA: 153 Prot.: 154
Phosphoserin-Phosphatase 2	serB	EP 1108790	DNA: 467 Prot.: 3967
Phosphoserin-Phosphatase 3	serB	EP 1108790	DNA: 334 Prot.: 3834
Phosphoserin-Aminotransferase	serC	WO 0100843	DNA: 151 Prot.: 152
Serin Acetyl-Transferase	cysE	WO 0100843	DNA: 243 Prot.: 244
Cystein-Synthase I	cysK	EP 1108790	DNA: 2817 Prot.: 6317
Cystein Synthase II	CysM	EP 1108790	DNA: 2338 Prot.: 5838
Homoserin-Dehydrogenase	hom	EP 1108790	DNA: 3452 Prot.: 6952
Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase	metE	WO 0100843	DNA: 755 Prot.: 756

Serin-Hydroxymethyltransferase	glyA	WO 0100843	DNA: 143 Prot.: 144
Protein in Sulfat-Reduktion	RXA247	EP 1108790	DNA: 3089 Prot.: 6589
Protein in Sulfat-Reduktion	RXA248	EP 1108790	DNA: 3090 Prot.: 6590
Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1	CysN	EP 1108790	DNA: 3092 Prot.: 6592
Sulfatadenyltransferase Untereinheit 2	CysD	EP 1108790	DNA: 3093 Prot.: 6593
Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase	CysH	WO 02729029	DNA: 7 Prot.: 8
Ferredoxin-Sulfit-Reduktase	RXA073	WO 0100842	DNA: 329 Prot.: 330
Ferredoxin NADP Reduktase	RXA076	WO 0100843	DNA: 79 Prot.: 80
Transkriptioneller Regulator LuxR	luxR	WO 0100842	DNA: 297 Protein: 298
Transkriptioneller Regulator LysR1	lysR1	EP 1108790	DNA: 676 Protein: 4176
Transkriptioneller Regulator LysR2	lysR2	EP 1108790	DNA: 3228 Protein: 6728
Transkriptioneller Regulator LysR3	lysR3	EP 1108790	DNA: 2200 Protein: 5700
Malat-Quinon-Oxodoreduktase	mgo	WO 0100844	DNA: 569 Protein: 570
Transketolase	RXA2739	EP 1108790	DNA: 1740 Prot: 5240
Transaldolase	RXA2738	WO 0100844	DNA: 245 Prot: 246
OPCA	opcA	WO 0100804	DNA: 79 Prot: 80
1-Phosphofructokinase 1	pfk1	WO0100844	DNA: 55 Protein: 56
1-Phosphofructokinase 2	pfk2	WO0100844	DNA: 57 Protein: 58
6-Phosphofructokinase 1	6-pfk1	EP 1108790	DNA: 1383 Protein: 4883

6-Phosphofructokinase 2	6-pfk2	DE 10112992	DNA: 1 Protein: 2
Fructose-1,6- biphosphatase 1	fbr1	EP1108790	DNA: 1136 Protein: 4636
Pyruvat Oxidase	poxB	WO 0100844	DNA : 85 Protein: 86
RXA00655-Regulator	RXA655	US2003162267 .2	DNA: 1 Prot.: 2
RXN02910-Regulator	RXN2910	US2003162267 .2	DNA: 5 Prot.: 6
6- phosphogluconolacto- nase	RXA2735	WO 0100844	DNA: 1 Prot.: 2

Ein weiteres Beispiel für eine besonders bevorzugte Proteinsequenz und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend dieses Protein aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, ist die Sequenz der Fructose-1,6-bisphosphatase 2, oder auch fbr2 genannt, (SEQ. ID. NO. 41) und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend eine Fructose-1,6-bisphosphatase 2 (SEQ. ID. NO. 40).

Ein weiteres Beispiel für eine besonders bevorzugte Proteinsequenz und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend dieses Protein aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, ist die Sequenz des Proteins in Sulfat-Reduktion, oder auch RXA077 genannt, (SEQ. ID. NO. 4) und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend ein Protein in Sulfat-Reduktion (SEQ. ID. NO. 3)

Weitere besonders bevorzugte Proteinsequenzen aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, weisen jeweils die in Tabelle 1 für dieses Protein angegebene Aminosäuresequenz auf, wobei das jeweilige Protein jeweils an mindestens einer der in Tabelle 2/Spalte2 für diese Aminosäuresequenz angegebenen Aminosäurepositionen eine andere proteinogene Aminosäure aufweist als die jeweilige in Tabelle2/Spalte3 in der gleichen Zeile angegebene Aminosäure. In einer weiter bevorzugten Ausführungsform, weisen die Proteine an mindestens einer der in Tabelle 2/Spalte 2 für die Aminosäuresequenz angegebenen Aminosäureposition die in Tabelle2/Spalte4 in der gleichen Zeile angegebene Aminosäure auf. Es handelt sich bei den in Tabelle 2 angegebenen Proteine um mutierte Proteine des Biosyntheseweges von Aminosäuren, die besonders vorteilhafte Eigenschaften aufweisen und sich deshalb insbesondere zur Expression der entsprechenden Nukleinsäuren durch den erfindungsgemäßen Promotor und zur Herstellung von Aminosäuren eignen. Beispielsweise führt die Mutation T311I zu

einem Ausschalten der feedback-Inhibierung von ask.

Die entsprechenden Nukleinsäuren, die ein vorstehend beschriebenes mutiertes Protein aus Tabelle 2 kodieren, lassen sich durch übliche verfahren herstellen.

5

Als Ausgangspunkt zur Herstellung der Nukleinsäuresequenzen kodierend ein mutiertes Protein eignet sich beispielsweise das Genom eines *Corynebacterium glutamicum*-Stammes, der von der American Type Culture Collection unter der Bezeichnung ATCC 13032 erhältlich ist oder die in Tabelle 1 in Bezug genommenen Nukleinsäuresequenzen. Für die Rückübersetzung der Aminosäuresequenz der mutierten Proteine in die Nukleinsäuresequenzen kodierend diese Proteine ist es vorteilhaft, die codon usage desjenigen Organismus zu verwenden, in den die Nukleinsäuresequenz eingebracht werden soll oder in der die Nukleinsäuresequenz vorliegt. Beispielsweise ist es vorteilhaft für *Corynebakterium glutamicum* die codon usage von *Corynebakterium glutamicum* zu verwenden. Die codon usage des jeweiligen Organismus lässt sich in an sich bekannter Weise aus Datenbanken oder Patentanmeldungen ermitteln, die zumindest ein Protein und ein Gen, das dieses Protein kodiert, aus dem gewünschten Organismus beschreiben.

20 Die Angaben in Tabelle 2 sind folgendermassen zu verstehen:

In Spalte 1 "Identifikation" wird eine eindeutige Bezeichnung für jede Sequenz in Bezug auf Tabelle 1 aufgeführt.

25 In Spalte 2 "AS-POS" bezieht sich die jeweilige Zahl auf die Aminosäureposition der entsprechenden Polypeptidsequenz aus Tabelle 1. Eine "26" in der Spalte "AS-POS" bedeutet demzufolge die Aminosäureposition 26 der entsprechend angegebenen Polypeptidsequenz. Die Zählung der Position beginnt N-Terminal bei +1.

30 In Spalte 3 "AS-Wildtyp" bezeichnet der jeweilige Buchstabe die Aminosäure – dargestellt im Ein-Buchstaben-Code- an der in Spalte 2 angegebenen Position beim entsprechenden Wildtyp-Stamm der Sequenz aus Tabelle 1.

35 In Spalte 4 "AS-Mutante" bezeichnet der jeweilige Buchstabe die Aminosäure – dargestellt im Ein-Buchstaben-Code- an der in Spalte 2 angegebenen Position beim entsprechenden Mutanten-Stamm.

In Spalte 5 "Funktion" wird die physiologische Funktion der entsprechenden Polypeptidsequenz aufgeführt.

40

- Für ein mutiertes Protein mit einer bestimmten Funktion (Spalte 5) und einer bestimmten Ausgangsaminosäuresequenz (Tabelle 1) werden in den Spalten 2,3 und 4 mindestens eine Mutation, bei einigen Sequenzen auch mehrere Mutationen beschrieben. Diese mehreren Mutationen beziehen sich immer auf die jeweils
- 5 obenstehende, nächstliegende Ausgangsaminosäuresequenz (Tabelle 1). Unter dem Begriff „mindestens eine der Aminosäurepositionen“ einer bestimmten Aminosäuresequenz wird vorzugsweise mindestens eine der für diese Aminosäuresequenz in Spalte 2, 3 und 4 beschriebenen Mutationen verstanden.
- 10 Ein-Buchstaben-Code der proteinogenen Aminosäuren:
- A Alanin
C Cystein
D Aspartat
15 E Glutamat
F Phenylalanin
G Glycin
H His
I Isoleucin
20 K Lysin
L Leucin
M Methionin
N Asparagin
P Prolin
25 Q Glutamin
R Arginin
S Serin
T Threonin
V Valin
30 W Tryptophan
Y Tyrosin

Tabelle 2

Spalte 1	Spalte 2	Spalte 3	Spalte 4	Spalte 5
Identifikation	AS Position	AS Wildtyp	AS Mutante	Funktion
ask	317	S	A	Aspartatkinase
	311	T	I	
	279	A	T	

asd	66	D	G	Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase
	234	R	H	
	272	D	E	
	285	K	E	
	20	L	F	
dapA	2	S	A	Dihydrodipicolinat Synthetase
	84	K	N	
	85	L	V	
dapB	91	D	A	Dihydrodipicolinat-Reduktase
	83	D	N	
ddh	174	D	E	Meso-Diaminopimelat-D-Dehydrogenase
	235	F	L	
	237	S	A	
lysA	265	A	D	Diaminopicolinat-Decarboxylase
	320	D	N	
	332	I	V	
argS	355	G	D	Arginyl-t-RNA-Synthetase
	156	A	S	
	513	V	A	
	540	H	R	
zwf	8	S	T	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
	150	T	A	
	321	G	S	
gap	264	G	S	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
pycA	7	S	L	Pyruvat-Carboxylase
	153	E	D	
	182	A	S	
	206	A	S	
	227	H	R	
	455	A	G	
	458	P	S	
	639	S	T	
	1008	R	H	
	1059	S	P	

	1120	D	E	
pck	162	H	Y	PEP-Carboxylase
	241	G	D	
	829	T	R	
thrB	103	S	A	Homoserin Kinase
	190	T	A	
	133	A	V	
	138	P	S	
thrC	69	G	R	Threonin Synthase
	478	T	I	
RXA330	85	I	M	Threonin-Efflux Protein
	161	F	I	
	195	G	D	
hom	104	V	I	Homoserin-Dehydrogenase
	116	T	I	
	148	G	A	
	59	V	A	
	270	T	S	
	345	R	P	
	268	K	N	
	61	D	H	
	72	E	Q	
lysR1	80	R	H	transkriptioneller Regulator LysR1
lysR3	142	R	W	transkriptioneller Regulator LysR3
	179	A	T	
RXA2739	75	N	D	Transketolase
	329	A	T	
	332	A	T	
	556	V	I	
RXA2738	242	K	M	Transaldolase
opcA	107	Y	H	OpcA
	219	K	N	
	233	P	S	
	261	Y	H	
	312	S	F	
	65	G	R	Aspartat-1-Decarboxylase
	33	G	S	6- Phosphogluconolactonase

In den vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen sowie den nachstehend beschriebenen Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Mikroorganismen, den nachstehend beschriebenen genetisch veränderten Mikroorganismen und den nachstehend beschriebenen Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten erfolgt das Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, der vorstehend beschriebenen Gene und der vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte oder Expressionskassetten in den Mikroorganismus, insbesondere in coryneforme Bakterien, vorzugsweise durch die SacB-Methode.

Die SacB-Methode ist dem Fachmann bekannt und beispielsweise in Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A.; Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the Escherichia coli plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of Corynebacterium glutamicum, Gene. 1994 Jul 22;145(1):69-73 und Blomfield IC, Vaughn V, Rest RF, Eisenstein BI.; Allelic exchange in Escherichia coli using the Bacillus subtilis sacB gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon; Mol Microbiol. 1991 Jun;5(6):1447-57 beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen durch Einbringen von erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität bzw. erfindungsgemäßen Expressionseinheiten in den Mikroorganismus.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen durch Einbringen der vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte oder Expressionskassetten in den Mikroorganismus.

Die Erfindung betrifft daher ferner eine Expressionskassette, umfassend mindestens eine erfindungsgemäße Expressionseinheit

mindestens eine weitere, zu exprimierende Nukleinsäuresequenz, also ein zu exprimierendes Gen und

gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente, wie beispielsweise einen Terminator,

- 5 wobei mindestens eine Expressionseinheit und eine weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft sind und die weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

Vorzugsweise ist die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz mindestens eine Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von Feinchemikalien.

10

Besonders bevorzugt ist die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend
15 ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren
20 kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen.

25

Bevorzugte Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren sind vorstehend und deren Beispiele in Tabelle 1 und 2 beschrieben.

30

In den erfindungsgemäßen Expressionskassetten ist die physikalische Lage der Expressionseinheit relativ zum zu exprimierenden Gen so gewählt, daß die Expressionseinheit die Transkription und vorzugsweise auch die Translation des zu exprimierenden Gens reguliert und damit die Bildung eines oder mehrerer Proteine ermöglicht. Die "Bildung ermöglichen" beinhaltet dabei die konstitutive Steigerung der Bildung, Abschwächung bzw. Blockierung der Bildung unter spezifischen Bedingungen und oder die Steigerung der Bildung unter spezifischen Bedingungen. Die "Bedingungen" umfassen dabei: (1) Zugabe einer Komponente zum Kulturmedium, (2) Entfernen einer
35 Komponente vom Kulturmedium, (3) Austausch einer Komponente im Kulturmedium durch eine zweite Komponente, (4) Erhöhung der Temperatur des Kulturmediums, (5) Erniedrigung der Temperatur des Kulturmediums, und (6) Regulierung der atmosphärischen Bedingungen, wie z.B. die Sauerstoff- oder Stickstoffkonzentration, in der das Kulturmedium gehalten wird.

40

Die Erfindung betrifft ferner einen Expressionsvektor enthaltend eine vorstehend beschriebene, erfindungsgemäße Expressionskassette.

5 Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert
10 werden.

Als Plasmide eignen sich solche besonders bevorzugt, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren, wie z. B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102: 93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107: 69-74 (1991))
15 beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren, wie z. B. pCLiK5MCS, oder solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160) oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)) oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

20 Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Remscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert,
25 der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Sirnon et al., Bio/ Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al.
30 1991, Journal of Bacteriology 173: 4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Transformation in den gewünschten Stamm von C. glutamicum überführt. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio-
35 technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Transkriptions-

rate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch

5 a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription mindestens eines endogenen Gens reguliert oder

10 b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

15 Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man

20 b1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

25 b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

30 b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

35 Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus mit erhöhter oder verursachter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, wobei

40 ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Ge-

nen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist oder

- 5 bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform ah) reguliert wird, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

- 10 Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man

- 15 bh1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

- 20 bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

- 25 bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

- 30 Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus mit reduzierter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, wobei

- 35 ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von mindestens einem, endogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder

- 40 br) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit reduzierter Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass die Transkription mindestens eines endogenen Gens unter der Kontrolle der eingebrachten

Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch

c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression mindestens eines endogenen Gens reguliert, im Vergleich zum Wildtyp oder

d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man

d1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

- ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder
- 5 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.
- 10 Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man
- 15 dh1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 20 dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 25 dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 30 Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus mit reduzierter Expressionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, wobei,
- 35 cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression von mindestens einem endogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder
- dr) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit reduzierter Expressionsaktivität in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass
- 40 die Expression mindestens eines Gens unter der Kontrolle der eingebrachten Expres-

sionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.

- 5 Ferner betrifft die Erfindung einen genetisch veränderter Mikroorganismus, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 und funktionell verknüpft ein zu eprimierendes Gen; wobei das Gen im Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

10 Besonders bevorzugt enthält dieser genetisch veränderte Mikroorganismus eine erfindungsgemäße Expressionskasette.

15 Besonders bevorzugt betrifft die vorliegende Erfindung genetisch veränderte Mikroorganismen, insbesondere coryneforme Bakterien, die einen Vektor, insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, der wenigstens ein rekombinantes Nukleinsäurekonstrukt erfindungsgemäßer Definition trägt, enthalten.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform der genetisch veränderten Mikroorganismen sind die vorstehend beschriebenen Gene mindestens eine Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von Feinchemikalien.

25 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der genetisch veränderten Mikroorganismen sind die vorstehend beschriebenen Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

35 Bevorzugte Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren sind ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-
40 Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkrip-

tioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller
 Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase,
 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-
 Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-
 5 Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Methylen-
 Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-
 Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-
 Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyru-
 vat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthase I, Cystein-Synthase II
 10 Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-
 Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin
 Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase,
 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Argi-
 nyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Se-
 15 rinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-
 Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-
 Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase

Besonders bevorzugte Beispiele der Proteine und Gene aus dem Biosyntheseweg von
 20 Aminosäuren sind vorstehend in Tabelle 1 und Tabelle 2 beschrieben.

Bevorzugte Mikroorganismen oder genetisch veränderte Mikroorganismen sind Bakte-
 rien, Algen, Pilze oder Hefen.

25 Besonders bevorzugte Mikroorganismen sind insbesondere coryneforme Bakterien.

Bevorzugte coryneforme Bakterien sind Bakterien der Gattung *Corynebacterium*, ins-
 besondere der Arten *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium acetoglutami-*
cum, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Cory-*
 30 *nebacterium melassecola* und *Corynebacterium efficiens* oder der Gattung *Brevibacte-*
rium, insbesondere der Arten *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*
 und *Brevibacterium divaricatum*.

Besonders bevorzugte Bakterien der Gattungen *Corynebacterium* und *Brevibacterium*
 35 sind ausgewählt aus der Gruppe *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Coryne-*
bacterium acetoglutamicum ATCC 15806, *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC
 13870, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Corynebacterium me-*
lassecola ATCC 17965, *Corynebacterium efficiens* DSM 44547, *Corynebacterium effi-*
ciens DSM 44548, *Corynebacterium efficiens* DSM 44549, *Brevibacterium flavum*
 40 ATCC 14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869, *Brevibacterium divarica-*

tum ATCC 14020, *Corynebacterium glutamicum* KFCC10065 und *Corynebacterium glutamicum* ATCC21608.

- 5 Mit der Abkürzung KFCC ist die Korean Federation of Culture Collection gemeint, mit der Abkürzung ATCC die American type strain culture collection, mit der Abkürzung DSM die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen.

Weitere besonders bevorzugte Bakterien der Gattungen *Corynebacterium* und *Brevibacterium* sind in Tabelle 3 aufgelistet:

10

Bakterium		Hinterlegungsnummer							
Genus	Species	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
Brevibacterium	ammoniagenes	21054							
Brevibacterium	ammoniagenes	19350							
Brevibacterium	ammoniagenes	19351							
Brevibacterium	ammoniagenes	19352							
Brevibacterium	ammoniagenes	19353							
Brevibacterium	ammoniagenes	19354							
Brevibacterium	ammoniagenes	19355							
Brevibacterium	ammoniagenes	19356							
Brevibacterium	ammoniagenes	21055							
Brevibacterium	ammoniagenes	21077							
Brevibacterium	ammoniagenes	21553							
Brevibacterium	ammoniagenes	21580							
Brevibacterium	ammoniagenes	39101							
Brevibacterium	butanicum	21196							
Brevibacterium	divaricatum	21792	P928						
Brevibacterium	flavum	21474							
Brevibacterium	flavum	21129							
Brevibacterium	flavum	21518							
Brevibacterium	flavum			B11474					
Brevibacterium	flavum			B11472					
Brevibacterium	flavum	21127							
Brevibacterium	flavum	21128							
Brevibacterium	flavum	21427							
Brevibacterium	flavum	21475							
Brevibacterium	flavum	21517							
Brevibacterium	flavum	21528							
Brevibacterium	flavum	21529							
Brevibacterium	flavum			B11477					
Brevibacterium	flavum			B11478					
Brevibacterium	flavum	21127							

Brevibacterium	flavum			B11474					
Brevibacterium	healii	15527							
Brevibacterium	ketoglutamicum	21004							
Brevibacterium	ketoglutamicum	21089							
Brevibacterium	ketosoreductum	21914							
Brevibacterium	lactofermentum				70				
Brevibacterium	lactofermentum				74				
Brevibacterium	lactofermentum				77				
Brevibacterium	lactofermentum	21798							
Brevibacterium	lactofermentum	21799							
Brevibacterium	lactofermentum	21800							
Brevibacterium	lactofermentum	21801							
Brevibacterium	lactofermentum			B11470					
Brevibacterium	lactofermentum			B11471					
Brevibacterium	lactofermentum	21086							
Brevibacterium	lactofermentum	21420							
Brevibacterium	lactofermentum	21086							
Brevibacterium	lactofermentum	31269							
Brevibacterium	linens	9174							
Brevibacterium	linens	19391							
Brevibacterium	linens	8377				:			
Brevibacterium	paraffinolyticum					11160			
Brevibacterium	spec.						717.73		
Brevibacterium	spec.						717.73		
Brevibacterium	spec.	14604							
Brevibacterium	spec.	21860							
Brevibacterium	spec.	21864							
Brevibacterium	spec.	21865							
Brevibacterium	spec.	21866							
Brevibacterium	spec.	19240							
Corynebacterium	acetoacidophilum	21476							
Corynebacterium	acetoacidophilum	13870							
Corynebacterium	acetoglutamicum			B11473					
Corynebacterium	acetoglutamicum			B11475					
Corynebacterium	acetoglutamicum	15806							
Corynebacterium	acetoglutamicum	21491							
Corynebacterium	acetoglutamicum	31270							
Corynebacterium	acetophilum			B3671					
Corynebacterium	ammoniagenes	6872						2399	
Corynebacterium	ammoniagenes	15511							
Corynebacterium	fujiokense	21496							
Corynebacterium	glutamicum	14067							

Corynebacterium	glutamicum	39137							
Corynebacterium	glutamicum	21254							
Corynebacterium	glutamicum	21255							
Corynebacterium	glutamicum	31830							
Corynebacterium	glutamicum	13032							
Corynebacterium	glutamicum	14305							
Corynebacterium	glutamicum	15455							
Corynebacterium	glutamicum	13058							
Corynebacterium	glutamicum	13059							
Corynebacterium	glutamicum	13060							
Corynebacterium	glutamicum	21492							
Corynebacterium	glutamicum	21513							
Corynebacterium	glutamicum	21526							
Corynebacterium	glutamicum	21543							
Corynebacterium	glutamicum	13287							
Corynebacterium	glutamicum	21851							
Corynebacterium	glutamicum	21253							
Corynebacterium	glutamicum	21514							
Corynebacterium	glutamicum	21516							
Corynebacterium	glutamicum	21299							
Corynebacterium	glutamicum	21300							
Corynebacterium	glutamicum	39684							
Corynebacterium	glutamicum	21488							
Corynebacterium	glutamicum	21649							
Corynebacterium	glutamicum	21650							
Corynebacterium	glutamicum	19223							
Corynebacterium	glutamicum	13869							
Corynebacterium	glutamicum	21157							
Corynebacterium	glutamicum	21158							
Corynebacterium	glutamicum	21159							
Corynebacterium	glutamicum	21355							
Corynebacterium	glutamicum	31808							
Corynebacterium	glutamicum	21674							
Corynebacterium	glutamicum	21562							
Corynebacterium	glutamicum	21563							
Corynebacterium	glutamicum	21564							
Corynebacterium	glutamicum	21565							
Corynebacterium	glutamicum	21566							
Corynebacterium	glutamicum	21567							
Corynebacterium	glutamicum	21568							
Corynebacterium	glutamicum	21569							
Corynebacterium	glutamicum	21570							

Corynebacterium	glutamicum	21571							
Corynebacterium	glutamicum	21572							
Corynebacterium	glutamicum	21573							
Corynebacterium	glutamicum	21579							
Corynebacterium	glutamicum	19049							
Corynebacterium	glutamicum	19050							
Corynebacterium	glutamicum	19051							
Corynebacterium	glutamicum	19052							
Corynebacterium	glutamicum	19053							
Corynebacterium	glutamicum	19054							
Corynebacterium	glutamicum	19055							
Corynebacterium	glutamicum	19056							
Corynebacterium	glutamicum	19057							
Corynebacterium	glutamicum	19058							
Corynebacterium	glutamicum	19059							
Corynebacterium	glutamicum	19060							
Corynebacterium	glutamicum	19185							
Corynebacterium	glutamicum	13286							
Corynebacterium	glutamicum	21515							
Corynebacterium	glutamicum	21527							
Corynebacterium	glutamicum	21544							
Corynebacterium	glutamicum	21492							
Corynebacterium	glutamicum			B8183					
Corynebacterium	glutamicum			B8182					
Corynebacterium	glutamicum			B12416					
Corynebacterium	glutamicum			B12417					
Corynebacterium	glutamicum			B12418					
Corynebacterium	glutamicum			B11476					
Corynebacterium	glutamicum	21608							
Corynebacterium	lilium		P973						
Corynebacterium	nitrilophilus	21419				11594			
Corynebacterium	spec.		P4445						
Corynebacterium	spec.		P4446						
Corynebacterium	spec.	31088							
Corynebacterium	spec.	31089							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	15954							20145
Corynebacterium	spec.	21857							
Corynebacterium	spec.	21862							
Corynebacterium	spec.	21863							

Die Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA

5 FERM: Fermentation Research Institute, Chiba, Japan

NRRL: ARS Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL, USA

CECT: Coleccion Espanola de Cultivos Tipo, Valencia, Spain

NCIMB: National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd., Aberdeen, UK

10 CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, NL

NCTC: National Collection of Type Cultures, London, UK

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany

15 Durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und den erfindungsgemäßen Expressionseinheiten ist es mit Hilfe der vorstehend beschriebenen, erfindungsgemäßen Verfahren möglich in den vorstehend beschriebenen, erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen die Stoffwechselwege zu spezifischen biosynthetischen Produkten zu regulieren.

20

Dazu werden beispielsweise Stoffwechselwege die zu einem spezifischen biosynthetischen Produkt führen durch Verursachung oder Erhöhung der Transkriptionrate bzw. Expressionsrate von Genen dieses Biosyntheseweges verstärkt in dem die erhöhte Proteinmenge zu einer erhöhten Gesamtaktivität dieser Proteine des gewünschten

25 Biosyntheseweges und damit zu einem verstärkten Stoffwechselfluß zu dem gewünschten biosynthetischen Produkt führt.

25

Weiterhin können Stoffwechselwege die von einem spezifischen biosynthetischen Produkt wegführen durch Reduzierung der Transkriptionrate bzw. Expressionsrate von

30 Genen dieses wegführenden Biosyntheseweges abgeschwächt werden in dem die reduzierte Proteinmenge zu einer reduzierten Gesamtaktivität dieser Proteine des unerwünschten Biosyntheseweges und damit zusätzlich zu einem verstärkten Stoffwechselfluß zu dem gewünschten biosynthetischen Produkt führt.

30

35 Die erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen sind beispielsweise in der Lage aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol biosynthetische Produkte herzustellen.

35

Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung von erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Mikroorganis-

40

men.

- Je nach gewünschtem biosynthetischen Produkt muss die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate verschiedener Gene erhöht bzw. reduziert werden. In der Regel ist es vorteilhaft die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate mehrere Gene zu verändern, d.h. die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate einer Kombination von Gene zu Erhöhen und/oder die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate einer Kombination von Gene zu reduzieren.
- 10 In den erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen ist mindestens eine veränderte, dass heißt erhöhte oder reduzierte Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate eines Gens auf eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität bzw. erfindungsgemäße Expressionseinheit zurückzuführen.
- 15 Weitere, zusätzliche veränderte, d.h. zusätzlich erhöhte oder zusätzlich reduzierte Transkriptionsraten bzw. Expressionsraten von weiteren Genen im genetisch veränderten Mikroorganismus können, müssen aber nicht auf die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität bzw. die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten zurück gehen.
- 20 Die Erfindung betrifft deshalb weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung von erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Mikroorganismen.
- 25 Bevorzugte biosynthetische Produkte sind Feinchemikalien.
- Der Begriff "Feinchemikalie" ist im Fachgebiet bekannt und beinhaltet Verbindungen, die von einem Organismus produziert werden und in verschiedenen Industriezweigen Anwendungen finden, wie bspw., jedoch nicht beschränkt auf die pharmazeutische Industrie, die Landwirtschafts-, Kosmetik, Food und Feed-Industrie. Diese Verbindungen umfassen organische Säuren, wie beispielsweise Weinsäure, Itaconsäure und Diaminopimelinsäure, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleoside und Nukleotide (wie bspw. beschrieben in Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, S. 561-612, in Biotechnology Bd. 6, Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten), Lipide, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (bspw. Arachidonsäure), Diole (bspw. Propan-
diol und Butandiol), Kohlenhydrate (bspw. Hyaluronsäure und Trehalose), aromatische Verbindungen (bspw. aromatische Amine, Vanillin und Indigo), Vitamine und Cofaktoren (wie beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A27, "Vitamins", S. 443-613 (1996) VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten; und

- Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press (1995)), Enzyme und
5 sämtliche anderen von Gutcho (1983) in Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 und den darin angegebenen Literaturstellen, beschriebenen Chemikalien. Der Metabolismus und die Verwendungen bestimmter Feinchemikalien sind nachstehend weiter erläutert.

10 I. Aminosäure-Metabolismus und Verwendungen

- Die Aminosäuren umfassen die grundlegenden Struktureinheiten sämtlicher Proteine und sind somit für die normalen Zellfunktionen essentiell. Der Begriff "Aminosäure" ist im Fachgebiet bekannt. Die proteinogenen Aminosäuren, von denen es 20 Arten gibt,
15 dienen als Struktureinheiten für Proteine, in denen sie über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind, wohingegen die nicht-proteinogenen Aminosäuren (von denen Hunderte bekannt sind) gewöhnlich nicht in Proteinen vorkommen (siehe Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57-97 VCH: Weinheim (1985)). Die Aminosäuren können in der D- oder L-Konfiguration vorliegen, obwohl L-Aminosäuren
20 gewöhnlich der einzige Typ sind, den man in natürlich vorkommenden Proteinen vorfindet. Biosynthese- und Abbauwege von jeder der 20 proteinogenen Aminosäuren sind sowohl bei prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellen gut charakterisiert (siehe bspw. Stryer, L. Biochemistry, 3. Auflage, S. 578-590 (1988)). Die "essentiellen"
25 Aminosäuren (Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan und Valin), so bezeichnet, da sie aufgrund der Komplexität ihrer Biosynthese mit der Ernährung aufgenommen werden müssen, werden durch einfache Biosynthesewege in die übrigen 11 "nichtessentiellen" Aminosäuren (Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Cystein, Glutamat, Glutamin, Glycin, Prolin, Serin und Tyrosin)
30 umgewandelt. Höhere Tiere besitzen die Fähigkeit, einige dieser Aminosäuren zu synthetisieren, jedoch müssen die essentiellen Aminosäuren mit der Nahrung aufgenommen werden, damit eine normale Proteinsynthese stattfindet.

- Abgesehen von ihrer Funktion bei der Proteinbiosynthese sind diese Aminosäuren interessante Chemikalien an sich, und man hat entdeckt, daß viele bei verschiedenen An-
35 wendungen in der Nahrungsmittel-, Futter-, Chemie-, Kosmetik-, Landwirtschafts- und pharmazeutischen Industrie zum Einsatz kommen. Lysin ist nicht nur für die Ernährung des Menschen eine wichtige Aminosäure, sondern auch für monogastrische Tiere, wie Geflügel und Schweine. Glutamat wird am häufigsten als Geschmacksadditiv (Mononatriumglutamat, MSG) sowie weithin in der Nahrungsmittelindustrie verwendet, wie
40 auch Aspartat, Phenylalanin, Glycin und Cystein. Glycin, L-Methionin und Tryptophan

werden sämtlich in der pharmazeutischen Industrie verwendet. Glutamin, Valin, Leucin, Isoleucin, Histidin, Arginin, Prolin, Serin und Alanin werden in der pharmazeutischen Industrie und der Kosmetikindustrie verwendet. Threonin, Tryptophan und D-/L-Methionin sind weitverbreitete Futtermittelzusätze (Leuchtenberger, W. (1996) Amino acids - technical production and use, S. 466-502 in Rehm et al., (Hrsg.) Biotechnology Bd. 6, Kapitel 14a, VCH: Weinheim). Man hat entdeckt, daß sich diese Aminosäuren außerdem als Vorstufen für die Synthese von synthetischen Aminosäuren und Proteinen, wie N-Acetylcystein, S-Carboxymethyl-L-cystein, (S)-5-Hydroxytryptophan und anderen, in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57-97, VCH, Weinheim, 1985 beschriebenen Substanzen eignen.

Die Biosynthese dieser natürlichen Aminosäuren in Organismen, die sie produzieren können, bspw. Bakterien, ist gut charakterisiert worden (für einen Überblick der bakteriellen Aminosäure-Biosynthese und ihrer Regulation, s. Umbarger, H.E. (1978) Ann. Rev. Biochem. 47: 533 - 606). Glutamat wird durch reduktive Aminierung von α -Ketoglutarat, einem Zwischenprodukt im Citronensäure-Zyklus, synthetisiert. Glutamin, Prolin und Arginin werden jeweils nacheinander aus Glutamat erzeugt. Die Biosynthese von Serin erfolgt in einem Dreischritt-Verfahren und beginnt mit 3-Phosphoglycerat (einem Zwischenprodukt bei der Glykolyse), und ergibt nach Oxidations-, Transaminierungs- und Hydrolyseschritten diese Aminosäure. Cystein und Glycin werden jeweils aus Serin produziert, und zwar die erstere durch Kondensation von Homocystein mit Serin, und die letztere durch Übertragung des Seitenketten- β -Kohlenstoffatoms auf Tetrahydrofolat, in einer durch Serintranshydroxymethylase katalysierten Reaktion. Phenylalanin und Tyrosin werden aus den Vorstufen des Glycolyse- und Pento- sephosphatweges, Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat in einem 9-Schritt-Biosyntheseweg synthetisiert, der sich nur in den letzten beiden Schritten nach der Synthese von Prephenat unterscheidet. Tryptophan wird ebenfalls aus diesen beiden Ausgangsmolekülen produziert, jedoch erfolgt dessen Synthese in einem 11-Schritt-Weg. Tyrosin läßt sich in einer durch Phenylalaninhydroxylase katalysierten Reaktion auch aus Phenylalanin herstellen. Alanin, Valin und Leucin sind jeweils Biosyntheseprodukte aus Pyruvat, dem Endprodukt der Glykolyse. Aspartat wird aus Oxalacetat, einem Zwischenprodukt des Citratzyklus, gebildet. Asparagin, Methionin, Threonin und Lysin werden jeweils durch Umwandlung von Aspartat produziert. Isoleucin wird aus Threonin gebildet. In einem komplexen 9-Schritt-Weg erfolgt die Bildung von Histidin aus 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat, einem aktivierten Zucker.

Aminosäuren, deren Menge den Proteinbiosynthesebedarf der Zelle übersteigt, können nicht gespeichert werden, und werden stattdessen abgebaut, so daß Zwischenprodukte für die Haupt-Stoffwechselwege der Zelle bereitgestellt werden (für einen Überblick siehe Stryer, L., Biochemistry, 3. Aufl. Kap. 21 "Amino Acid Degradation and the Urea

Cycle"; S 495-516 (1988)). Die Zelle ist zwar in der Lage, ungewünschte Aminosäuren in nützliche Stoffwechsel-Zwischenprodukte umzuwandeln, jedoch ist die Aminosäureproduktion hinsichtlich der Energie, der Vorstufenmoleküle und der für ihre Synthese nötigen Enzyme aufwendig. Es überrascht daher nicht, daß die Aminosäure-Biosynthese durch Feedback-Hemmung reguliert wird, wobei das Vorliegen einer bestimmten Aminosäure ihre eigene Produktion verlangsamt oder ganz beendet (für einen Überblick über den Rückkopplungs-Mechanismus bei Aminosäure-Biosynthesewegen, siehe Stryer, L., Biochemistry, 3. Aufl., Kap. 24, "Biosynthesis of Amino Acids and Heme", S. 575-600 (1988)). Der Ausstoß einer bestimmten Aminosäure wird daher durch die Menge dieser Aminosäure in der Zelle eingeschränkt.

II. Vitamine, Cofaktoren und Nutrazeutika-Metabolismus sowie Verwendungen

Vitamine, Cofaktoren und Nutrazeutika umfassen eine weitere Gruppe von Molekülen. Höhere Tiere haben die Fähigkeit verloren, diese zu synthetisieren und müssen sie somit aufnehmen, obwohl sie leicht durch andere Organismen, wie Bakterien, synthetisiert werden. Diese Moleküle sind entweder biologisch aktive Moleküle an sich oder Vorstufen von biologisch aktiven Substanzen, die als Elektronenträger oder Zwischenprodukte bei einer Reihe von Stoffwechselwegen dienen. Diese Verbindungen haben neben ihrem Nährwert auch einen signifikanten industriellen Wert als Farbstoffe, Antioxidantien und Katalysatoren oder andere Verarbeitungs-Hilfsstoffe. (Für einen Überblick über die Struktur, Aktivität und die industriellen Anwendungen dieser Verbindungen siehe bspw. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996). Der Begriff "Vitamin" ist im Fachgebiet bekannt und umfaßt Nährstoffe, die von einem Organismus für eine normale Funktion benötigt werden, jedoch nicht von diesem Organismus selbst synthetisiert werden können. Die Gruppe der Vitamine kann Cofaktoren und nutrazeutische Verbindungen umfassen. Der Begriff "Cofaktor" umfaßt nicht-proteinartige Verbindungen, die für das Auftreten einer normalen Enzymaktivität nötig sind. Diese Verbindungen können organisch oder anorganisch sein; die erfindungsgemäßen Cofaktor-Moleküle sind vorzugsweise organisch. Der Begriff "Nutrazeutikum" umfaßt Nahrungsmittelzusätze, die bei Pflanzen und Tieren, insbesondere dem Menschen, gesundheitsfördernd sind. Beispiele solcher Moleküle sind Vitamine, Antioxidantien und ebenfalls bestimmte Lipide (z.B. mehrfach ungesättigte Fettsäuren).

Die Biosynthese dieser Moleküle in Organismen, die zu ihrer Produktion befähigt sind, wie Bakterien, ist umfassend charakterisiert worden (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996, Michal, G. (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley & Sons; Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and

Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press, Champaign, IL X, 374 S).

- 5 Thiamin (Vitamin B₁) wird durch chemisches Kuppeln von Pyrimidin und Thiazol-Einheiten gebildet. Riboflavin (Vitamin B₂) wird aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) und Ribose-5'-phosphat synthetisiert. Riboflavin wiederum wird zur Synthese von Flavin-mononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) eingesetzt. Die Familie von Verbindungen, die gemeinsam als "Vitamin B₆" bezeichnet werden (bspw. Pyridoxin, 10 Pyridoxamin, Pyridoxal-5'-phosphat und das kommerziell verwendete Pyridoxinhydrochlorid), sind alle Derivate der gemeinsamen Struktureinheit 5-Hydroxy-6-methylpyridin. Panthothenat (Pantothenensäure, R-(+)-N-(2,4-Dihydroxy-3,3-dimethyl-1-oxobutyl)-β-alanin) kann entweder durch chemische Synthese oder durch Fermentation hergestellt werden. Die letzten Schritte bei der Pantothenat-Biosynthese bestehen aus 15 der ATP-getriebenen Kondensation von β-Alanin und Pantoinsäure. Die für die Biosyntheseschritte für die Umwandlung in Pantoinsäure, in β-Alanin und zur Kondensation in Pantothenensäure verantwortlichen Enzyme sind bekannt. Die metabolisch aktive Form von Pantothenat ist Coenzym A, dessen Biosynthese über 5 enzymatische Schritte verläuft. Pantothenat, Pyridoxal-5'-phosphat, Cystein und ATP sind die Vorstufen von 20 Coenzym A. Diese Enzyme katalysieren nicht nur die Bildung von Pantothenat, sondern auch die Produktion von (R)-Pantoinsäure, (R)-Pantolacton, (R)-Panthenol (Provitamin B₅), Pantethein (und seinen Derivaten) und Coenzym A.

- Die Biosynthese von Biotin aus dem Vorstufenmolekül Pimeloyl-CoA in Mikroorganismen ist ausführlich untersucht worden, und man hat mehrere der beteiligten Gene identifiziert. Es hat sich herausgestellt, daß viele der entsprechenden Proteine an der Fe-Cluster-Synthese beteiligt sind und zu der Klasse der nifS-Proteine gehören. Die Liponsäure wird von der Octanonsäure abgeleitet und dient als Coenzym beim Energie-Metabolismus, wo sie Bestandteil des Pyruvatdehydrogenasekomplexes und des 30 α-Ketoglutaratdehydrogenasekomplexes wird. Die Folate sind eine Gruppe von Substanzen, die alle von der Folsäure abgeleitet werden, die wiederum von L-Glutaminsäure, p-Aminobenzoessäure und 6-Methylpterin hergeleitet ist. Die Biosynthese der Folsäure und ihrer Derivate, ausgehend von den metabolischen Stoffwechselzwischenprodukten Guanosin-5'-triphosphat (GTP), L-Glutaminsäure und p- 35 Aminobenzoessäure ist in bestimmten Mikroorganismen eingehend untersucht worden.

- Corrinoide (wie die Cobalamine und insbesondere Vitamin B₁₂) und die Porphyrine gehören zu einer Gruppe von Chemikalien, die sich durch ein Tetrapyrrol-Ringsystem auszeichnen. Die Biosynthese von Vitamin B₁₂ ist hinreichend komplex, daß sie noch 40 nicht vollständig charakterisiert worden ist, jedoch ist inzwischen ein Großteil der betei-

ligten Enzyme und Substrate bekannt. Nikotinsäure (Nikotinat) und Nikotinamid sind Pyridin-Derivate, die auch als "Niacin" bezeichnet werden. Niacin ist die Vorstufe der wichtigen Coenzyme NAD (Nikotinamidadenindinukleotid) und NADP (Nikotinamidadenindinukleotidphosphat) und ihrer reduzierten Formen.

5

Die Produktion dieser Verbindungen im Großmaßstab beruht größtenteils auf zellfreien chemischen Synthesen, obwohl einige dieser Chemikalien ebenfalls durch großangelegte Anzucht von Mikroorganismen produziert worden sind, wie Riboflavin, Vitamin B₆, Pantothenat und Biotin. Nur Vitamin B₁₂ wird aufgrund der Komplexität seiner Synthese lediglich durch Fermentation produziert. In-vitro-Verfahren erfordern einen erheblichen Aufwand an Materialien und Zeit und häufig an hohen Kosten.

10

III. Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- und Nukleotid-Metabolismus und Verwendungen

15 Gene für den Purin- und Pyrimidin-Stoffwechsel und ihre entsprechenden Proteine sind wichtige Ziele für die Therapie von Tumorerkrankungen und Virusinfektionen. Der Begriff "Purin" oder "Pyrimidin" umfaßt stickstoffhaltige Basen, die Bestandteil der Nukleinsäuren, Coenzyme und Nukleotide sind. Der Begriff "Nukleotid" beinhaltet die grundlegenden Struktureinheiten der Nukleinsäuremoleküle, die eine stickstoffhaltige Base, einen Pentose-Zucker (bei RNA ist der Zucker Ribose, bei DNA ist der Zucker D-Desoxyribose) und Phosphorsäure umfassen. Der Begriff "Nukleosid" umfaßt Moleküle, die als Vorstufen von Nukleotiden dienen, die aber im Gegensatz zu den Nukleotiden keine Phosphorsäureeinheit aufweisen. Durch Hemmen der Biosynthese dieser Moleküle oder ihrer Mobilisation zur Bildung von Nukleinsäuremolekülen ist es möglich, die RNA- und DNA-Synthese zu hemmen; wird diese Aktivität zielgerichtet bei kanzerogenen Zellen gehemmt, läßt sich die Teilungs- und Replikations-Fähigkeit von Tumorzellen hemmen.

20

25

Es gibt zudem Nukleotide, die keine Nukleinsäuremoleküle bilden, jedoch als Energiespeicher (d.h. AMP) oder als Coenzyme (d.h. FAD und NAD) dienen.

30

Mehrere Veröffentlichungen haben die Verwendung dieser Chemikalien für diese medizinischen Indikationen beschrieben, wobei der Purin- und/oder Pyrimidin-Metabolismus beeinflusst wird (bspw. Christopherson, R.I. und Lyons, S.D. (1990) "Potent inhibitors of de novo pyrimidine and purine biosynthesis as chemotherapeutic agents", Med. Res. Reviews 10: 505-548). Untersuchungen an Enzymen, die am Purin- und Pyrimidin-Metabolismus beteiligt sind, haben sich auf die Entwicklung neuer Medikamente konzentriert, die bspw. als Immunsuppressionsmittel oder Antiproliferantien verwendet werden können (Smith, J.L. "Enzymes in Nucleotide Synthesis" Curr. Opin. Struct. Biol. 5 (1995) 752-757; Biochem. Soc. Transact. 23 (1995) 877-902). Die Purin-

35

40

und Pyrimidinbasen, Nukleoside und Nukleotide haben jedoch auch andere Einsatzmöglichkeiten: als Zwischenprodukte bei der Biosynthese verschiedener Feinchemikalien (z.B. Thiamin, S-Adenosyl-methionin, Folate oder Riboflavin), als Energieträger für die Zelle (bspw. ATP oder GTP) und für Chemikalien selbst, werden gewöhnlich als

5 Geschmacksverstärker verwendet (bspw. IMP oder GMP) oder für viele medizinische Anwendungen (siehe bspw. Kuninaka, A., (1996) "Nucleotides and Related Compounds in Biotechnology Bd. 6, Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim, S. 561-612). Enzyme, die am Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- oder Nukleotid-Metabolismus beteiligt sind, dienen auch immer stärker als Ziele, gegen die Chemikalien für den Pflanzenschutz,

10 einschließlich Fungiziden, Herbiziden und Insektiziden entwickelt werden.

Der Metabolismus dieser Verbindungen in Bakterien ist charakterisiert worden (für Übersichten siehe bspw. Zalkin, H. und Dixon, J.E. (1992) "De novo purin nucleotide biosynthesis" in Progress in Nucleic Acids Research and Molecular biology, Bd. 42,

15 Academic Press, S. 259-287; und Michal, G. (1999) "Nucleotides and Nucleosides"; Kap. 8 in : Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, Wiley, New York). Der Purin-Metabolismus, das Objekt intensiver Forschung, ist für das normale Funktionieren der Zelle essentiell. Ein gestörter Purin-Metabolismus in höheren Tieren kann schwere Erkrankungen verursachen, bspw. Gicht. Die Purinnukleotide

20 werden über eine Reihe von Schritten über die Zwischenverbindung Inosin-5'-phosphat (IMP) aus Ribose-5-phosphat synthetisiert, was zur Produktion von Guanosin-5'-monophosphat (GMP) oder Adenosin-5'-monophosphat (AMP) führt, aus denen sich die als Nukleotide verwendeten Triphosphatformen leicht herstellen lassen. Diese Verbindungen werden auch als Energiespeicher verwendet, so daß ihr Abbau Energie für

25 viele verschiedene biochemische Prozesse in der Zelle liefert. Die Pyrimidinbiosynthese erfolgt über die Bildung von Uridin-5'-monophosphat (UMP) aus Ribose-5-phosphat. UMP wiederum wird in Cytidin-5'-triphosphat (CTP) umgewandelt. Die Desoxyformen sämtlicher Nukleotide werden in einer Einschnitt-Reduktionsreaktion aus der Diphosphat-Riboseform des Nukleotides zur Diphosphat-Desoxyriboseform des Nukle-

30 otides hergestellt. Nach der Phosphorylierung können diese Moleküle an der DNA-Synthese teilnehmen.

IV. Trehalose-Metabolismus und Verwendungen

35 Trehalose besteht aus zwei Glucosemolekülen, die über α,α -1,1-Bindung miteinander verknüpft sind. Sie wird gewöhnlich in der Nahrungsmittelindustrie als Süßstoff, als Additiv für getrocknete oder gefrorene Nahrungsmittel sowie in Getränken verwendet. Sie wird jedoch auch in der pharmazeutischen Industrie, der Kosmetik- und Biotechnologie-Industrie angewendet (s. bspw. Nishimoto et al., (1998) US-Patent Nr. 5 759 610;

40 Singer, M.A. und Lindquist, S. Trends Biotech. 16 (1998) 460-467; Paiva, C.L.A. und

Panek, A.D. Biotech Ann. Rev. 2 (1996) 293-314; und Shiosaka, M. J. Japan 172 (1997) 97-102). Trehalose wird durch Enzyme von vielen Mikroorganismen produziert und auf natürliche Weise in das umgebende Medium abgegeben, aus dem sie durch im Fachgebiet bekannte Verfahren gewonnen werden kann.

5

Besonders bevorzugte biosynthetische Produkte sind ausgewählt aus der Gruppe organische Säuren, Proteine, Nukleotide und Nukleoside, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Lipide und Fettsäuren, Diole, Kohlehydrate, aromatische Verbindungen, Vitamine und Cofaktoren, Enzyme und Proteine.

10

Bevorzugte organische Säuren sind Weinsäure, Itaconsäure und Diaminopimelinsäure

Bevorzugte Nukleoside und Nukleotide sind beispielsweise beschrieben in Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, S. 561-612, in Biotechnology Bd. 6,

15

Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten.

Bevorzugte biosynthetische Produkte sind weiterhin Lipide, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren, wie beispielsweise Arachidonsäure, Diole wie beispielsweise Propandiol und Butandiol, Kohlenhydrate, wie beispielsweise Hyaluronsäure und Trehalose, aromatische Verbindungen, wie beispielsweise aromatische Amine, Vanillin und Indigo, Vitamine und Cofaktoren, wie beispielsweise beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A27, "Vitamins", S. 443-613 (1996) VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten; und Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press (1995)), Enzyme Polyketide (Cane et al. (1998) *Science* 282: 63-68), und sämtliche anderen von Gutcho (1983) in Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 und den darin angegebenen Literaturstellen, beschriebenen Chemikalien.

30

Besonders bevorzugte biosynthetische Produkte sind Aminosäuren, besonders bevorzugt essentielle Aminosäuren, insbesondere L-Glycin, L-Alanin, L-leucin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Tryptophan, L-Lysin, L-Glutamin, L-Glutaminsäure, L-Serin, L-Prolin, L-Valin, L-Isoleucin, L-Cystein, L-Tyrosin, L-Histidin, L-Arginin, L-Asparagin, L-Asparaginsäure und L-Threonin, L-Homoserin, insbesondere L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin. Im folgenden wird unter einer Aminosäure, wie beispielsweise Lysin, Methionin und Threonin, sowohl jeweils die L- und die D-Form der Aminosäure, vorzugsweise die L-Form, also beispielsweise L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin verstanden.

40

Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zur Herstellung von Lysin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

5 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheit, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

10 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind,

und wobei die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine
15 Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat- Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat- Decarboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydrodipicolinate-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydridipicolinate-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat-Isomerase, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LuxR, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR1, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR2, Nukleinsäuren kodierend eine Malat-Quinon-
20 Oxodoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend einen Lysin Exporter, Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, Nukleinsäuren kodierend eine Arginyl-t-RNA-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend
30 eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein Protein OPCA, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase und Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphofructokinase.

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression
35 dieser Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) dadurch erreicht, dass man

dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit
40 erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus ein-

bringt, so dass die Expression eines oder mehrerer dieser endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

- 5 dh2) ein oder mehrere dieser Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 10 dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 15 Eine weiter bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Lysin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe
Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat-Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat-Decarboxylase-Aktivität, Dihydrodipicolinate-Synthetase-Aktivität, Dihydrodipicolinate-Reduktase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat-Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat-Isomerase-Aktivität, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LuxR, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LysR1, Aktivität
20 des Transkriptionellen Regulators LysR2, Malat-Quinon-Oxodoreduktase-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase-Aktivität, Transketolase-Aktivität, Transaldolase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Arginyl-t-RNA-Synthetase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Fruktose-1,6-bisphosphatase-Aktivität, Protein OpcA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität,
25 6-Phosphofructokinase-Aktivität und Biotin-Ligase-Aktivität aufweisen.
- 30

- Eine weiter besonders bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Lysin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Homoserine-Kinase-Aktivität, Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität, Threonin-Exporter-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-
35

Decarboxylase-Aktivität und Threonin-Synthase-Aktivität aufweisen.

5 Diese zusätzlichen, erhöhten oder reduzierten Aktivitäten mindestens einer der vorstehend beschriebenen Aktivitäten können, müssen aber nicht durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität und/oder eine erfindungsgemäße Expressionseinheit verursacht sein.

10 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Methionin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

15 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheit, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind,

20 und wobei die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-
25 Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin O-Acetyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-gamma-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-beta-Lyase, Nukleinsäuren kodierend eine Serin-Hydroxymethyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine O-
30 Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Nukleinsäuren kodierend eine Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Aminotransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Phosphatase, Nukleinsäuren kodierend eine Serine Acetyl-Transferase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase Aktivität I, Nukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase Aktivität
35 II, Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Sulfat-Adenylyltransferase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Reductase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin-Sulfit-Reduktase-Aktivität, Nukleinsäuren
40 kodierend eine Ferredoxin NADPH-Reduktase Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine

Ferredoxin-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Nukleinsäuren kodierend eine, RXA0655 Regulator und Nukleinsäuren kodierend einen RXN2910 Regulator.

5

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression dieser Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) dadurch erreicht, dass man

10

dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer dieser endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

15

dh2) ein oder mehrere dieser Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

20

dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

25

Eine weiter bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Methionin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Homoserin Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Cystathionin-gamma-Synthase-Aktivität, Cystathionin-beta-Lyase-Aktivität Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase-Aktivität, Phosphoserin-Aminotransferase-Aktivität, Phosphoserin-Phosphatase-Aktivität, Serine Acetyltransferase-Aktivität, Cystein-Synthase-Aktivität, Cystein-Synthase II -Aktivität, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfat-Adenylyltransferase-Aktivität, Phosphoadenosin-

30

35

40

Phosphosulfat-Reductase-Aktivität, Ferredoxin-Sulfit-Reduktase-Aktivität, Ferredoxin NADPH-Reduktase Aktivität, Ferredoxin-Aktivität Aktivität Proteins der Sulfat-Reduktion RXA077, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA248, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA247, Aktivität eines RXA655-Regulators und
5 Aktivität eines RXN2910-Regulators aufweisen

Eine weiter besonders bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Methionin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Homoserine-Kinase-Aktivität, Threonin-Dehydratase-Aktivität, Threonin Synthase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität, und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.
10

15 Diese zusätzlichen, erhöhten oder reduzierten Aktivitäten mindestens einer der vorstehend beschriebenen Aktivitäten können, müssen aber nicht durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität und/oder eine erfindungsgemäße Expressionseinheit verursacht sein.

20 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Threonin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

25 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheit, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind,
30

und wobei die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Threonin Synthase, Nukleinsäuren kodierend einen Threonin Exporter Carrier, Nukleinsäuren
35
40

kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, Nukleinsäuren kodierend einer Malat-Quinon-Oxidoreductase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend einen Lysin-Exporter, Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend ein Threonin Efflux-Protein, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein Op-
cA Protein, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphofructokinase, und Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-Dehydrogenase

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression dieser Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) dadurch erreicht, dass man

dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer dieser endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

dh2) ein oder mehrere dieser Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Eine weiter bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Threonin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Threonin Synthase-Aktivität, Aktivität eines Threonin Export-Carriers, Transaldolase-Aktivität, Transketola-

se-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase-Aktivität, Malat-Qinon-Oxidoreductase-Aktivität, Homoserin-Kinase-Aktivität, Biotin-Ligase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Protein OpcA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität, 6-Phosphofructokinase-Aktivität, Fruktose 1,6 bisphosphatase-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität aufweisen.

Eine weiter besonders bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Threonin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthetase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-Decarboxylase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Acetolactat-Synthase-Aktivität, Ketol-Aid-Reductoisomerase-Aktivität, Branched chain aminotransferase-Aktivität, Coenzym B12-abhängige Methionin Synthase-Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methion Synthase-Aktivität, Dihydroxy-acid Dehydratase-Aktivität und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.

Diese zusätzlichen, erhöhten oder reduzierten Aktivitäten mindestens einer der vorstehend beschriebenen Aktivitäten können, müssen aber nicht durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität und/oder eine erfindungsgemäße Expressionseinheit verursacht sein.

Unter dem Begriff der „Aktivität“ eines Proteins wird bei Enzymen die Enzymaktivität des entsprechenden Proteins, bei anderen Proteinen, beispielsweise Struktur oder Transport-Proteinen die physiologische Aktivität der Proteine verstanden.

Die Enzyme sind in der Regel in der Lage ein Substrat in ein Produkt umzuwandeln bzw. diesen Umwandlungsschritt zu katalysieren.

Dementsprechend wird unter der „Aktivität“ eines Enzyms die in einer bestimmten Zeit durch das Enzym umgesetzte Menge Substrat bzw. gebildete Menge Produkt verstanden.

Bei einer erhöhten Aktivität im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Enzym die umgesetzte Menge Substrat

bzw. die gebildete Menge Produkt erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der „Aktivität“ bei allen vorstehend und nachstehend beschriebenen Aktivitäten mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der „Aktivität des Wildtyps“.

Bei einer reduzierten Aktivität im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Enzym die umgesetzte Menge Substrat bzw. die gebildete Menge Produkt reduziert.

Unter einer reduzierten Aktivität wird vorzugsweise die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität diese Enzyms in einem Mikroorganismus verstanden.

Eine Reduzierung der Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung eines Enzyms bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen des Enzyms (d.h. fehlende Nachweisbarkeit der entsprechenden Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit des Enzyms). Vorzugsweise wird die Aktivität im Mikroorganismus im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint „Reduzierung“ auch das vollständigen Fehlen der entsprechenden Aktivität.

Die Aktivität bestimmter Enzyme in genetisch veränderten Mikroorganismen sowie im Wildtyp und damit die Erhöhung oder Reduzierung der Enzymaktivität lassen sich nach bekannten Verfahren, wie beispielsweise Enzymassays ermitteln.

Beispielsweise wird unter eine Pyruvatcarboxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Pyruvat in Oxaloacetat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter einer Pyruvatcarboxylase–Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Pyruvatcarboxylase umgesetzte Menge Pyruvat bzw. gebildete Menge Oxaloacetat verstanden.

Bei einer erhöhten Pyruvatcarboxylase–Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Pyruvatcarboxylase die umgesetzte Menge Pyruvat bzw. die gebildete Menge Oxaloacetat erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Pyruvatcarboxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Pyruvatcarboxylase -Aktivität des Wildtyps.

Weiterhin wird beispielsweise unter eine Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität die Enzymaktivität einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase verstanden.

Unter einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Oxaloacetat in Phosphoenolpyruvat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phosphoenolpyruvat umgesetzte Menge Oxaloacetat bzw. gebildete Menge Phosphoenolpyruvat verstanden.

Bei einer reduzierten Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase die umgesetzte Menge Oxaloacetat bzw. die gebildete Menge Phosphoenolpyruvat reduziert.

Eine Reduzierung der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase). Vorzugsweise wird die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint "Reduzierung" auch das vollständige Fehlen der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase -Aktivität.

Die zusätzliche Erhöhung von Aktivitäten kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren kodierend die vorstehend beschriebenen Proteine gegenüber dem Wildtyp.

Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren kodierend die vorstehend beschriebenen Proteine gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung des Gens durch Aktivatoren oder wie

vorstehend beschrieben durch Erhöhung der Promotoraktivität oder Erhöhung der Expressionsaktivität oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Genkopien in den Mikroorganismus.

- 5 Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend ein Protein wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Mikroorganismus eigenen, endogenen Proteine verstanden.

- 10 Dies kann beispielsweise, wie vorstehend beschrieben durch Veränderung der Promotor- und/oder Expressionseinheits-Sequenzen der Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

- 15 Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Proteine durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdsubstanzen erfolgen.

- 20 Zur Erzielung einer Erhöhung der Genexpression kann der Fachmann weitere unterschiedliche Maßnahmen einzeln oder in Kombination ergreifen. So kann beispielsweise die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der mRNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.
- 30

- Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Biotechnology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0472869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Biotechnology 9, 84-87 (1991)), bei Remscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15-24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195
- 35
- 40

(1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60 : 512-538 (1996) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

- 5 Weiterhin kann es für die Produktion von biosynthetischen Produkten, insbesondere L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin, vorteilhaft sein, neben der Expression bzw. Verstärkung eines Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).
- 10 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eines der vorstehend beschriebenen Proteine durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein entsprechendes Protein in den Mikroorganismus. Das Einbringen der Nukleinsäure kann chromosomal oder extrachromosomal erfolgen, also durch Erhöhung der Kopienzahl auf dem Chromosom und oder
- 15 eine Kopie des Gens auf einem sich replizierenden Plasmid in dem Wirtsmikroorganismus.

- Vorzugsweise erfolgt das Einbringen der Nukleinsäure, beispielsweise in Form einer Expressionskassette, enthaltend die Nukleinsäure, chromosomal, insbesondere durch
- 20 die vorstehend beschriebene SacB-Methode.

Dazu kann prinzipiell jedes Gen, das eines der vorstehend beschriebenen Proteine kodiert verwendet werden.

- 25 Bei genomischen Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das der Wirtsmikroorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Proteine zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

- 30 Beispiele für die entsprechenden Gene sind in Tabelle 1 und 2 aufgelistet.

- Vorzugsweise erfolgt die Reduzierung der vorstehend beschriebenen Aktivitäten in Mikroorganismen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren:

- 35
- Einbringen mindestens einer sense-Ribonukleinsäuresequenz zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette

- Einbringen mindestens eines DNA- oder Protein-bindenden Faktors gegen das entsprechende -Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 5
- Einbringen mindestens einer den RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 10
- Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung eines Funktionsverlustes, wie beispielsweise die Generierung von Stopp-Kodons oder eine Verschiebungen im Leseraster, an einem Gen beispielsweise durch Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem Gen. Bevorzugt können Knockout-Mutanten mittels gezielter Insertion in das gewünschte Zielgen durch homologe Rekombination oder Einbringen von sequenzspezifischen Nukleasen gegen das Zielgen generiert werden.
- 15
- Einbringen eines Promotors mit reduzierter Promotoraktivität oder einer Expressionseinheit mit reduzierter Expressionsaktivität.

20 Dem Fachmann ist bekannt, dass auch weitere Verfahren im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Reduzierung seiner Aktivität oder Funktion eingesetzt werden können. Beispielsweise kann auch das Einbringen einer dominant-negativen Variante eines Proteins oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette vorteilhaft sein.

25 Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität eines Proteins bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung des Proteins, des Transports des Proteins oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des
30 RNA-Spleißens, Induktion eines RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translationselongation oder -termination umfassen.

Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Mikroorganismen ein
35 Isolieren von biosynthetischen Produkten aus den Mikroorganismen oder/oder aus der Fermentationsbrühe angeschlossen. Diese Schritte können gleichzeitig und/oder vorzugsweise nach dem Kultivierungsschritt stattfinden.

Die erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen können kontinuierlich
40 oder diskontinuierlich im batch- Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulauf-

verfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zur Produktion von biosynthetischen Produkten, insbesondere L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin, kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) zu finden.

Das zu verwendende Kulturmedium hat in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme zu genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods für General Bacteriology" der American Society für Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) enthalten.

Diese erfindungsgemäß einsetzbaren Medien umfassen gewöhnlich eine oder mehrere Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganische Salze, Vitamine und/oder Spurenelemente.

Bevorzugte Kohlenstoffquellen sind Zucker, wie Mono-, Di- oder Polysaccharide. Sehr gute Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose. Man kann Zucker auch über komplexe Verbindungen, wie Melassen, oder andere Nebenprodukte der Zucker-Raffinierung zu den Medien geben. Es kann auch vorteilhaft sein, Gemische verschiedener Kohlenstoffquellen zuzugeben. Andere mögliche Kohlenstoffquellen sind Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure oder Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin, Methanol oder Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure oder Milchsäure.

Stickstoffquellen sind gewöhnlich organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispielhafte Stickstoffquellen umfassen Ammoniak-Gas oder Ammoniumsalze, wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat oder Ammoniumnitrat, Nitrate, Harnstoff, Aminosäuren oder komplexe Stickstoffquellen, wie Maisquellwasser, Sojamehl, Sojaprotein, Hefeextrakt, Fleischextrakt und andere. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Anorganische Salzverbindungen, die in den Medien enthalten sein können, umfassen die Chlorid-, Phosphor- oder Sulfatsalze von Calcium, Magnesium, Natrium, Kobalt, Molybdän, Kalium, Mangan, Zink, Kupfer und Eisen

Als Schwefelquelle für die Herstellung von Feinchemikalien, insbesondere von Methionin, können anorganische Verbindungen wie beispielsweise Sulfate, Sulfite, Dithionite, Tetrathionate, Thiosulfate, Sulfide aber auch organische Schwefelverbindungen, wie Mercaptane und Thiole, verwendet werden.

5

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden.

- 10 Chelatbildner können zum Medium gegeben werden, um die Metallionen in Lösung zu halten. Besonders geeignete Chelatbildner umfassen Dihydroxyphenole, wie Catechol oder Protocatechuat, oder organische Säuren, wie Citronensäure.

- 15 Die erfindungsgemäß eingesetzten Fermentationsmedien enthalten üblicherweise auch andere Wachstumsfaktoren, wie Vitamine oder Wachstumsförderer, zu denen beispielsweise Biotin, Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nikotinsäure, Panthothenat und Pyridoxin gehören. Wachstumsfaktoren und Salze stammen häufig von komplexen Medienkomponenten, wie Hefeextrakt, Melassen, Maisquellwasser und dergleichen. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genaue
20 Zusammensetzung der Medienverbindungen hängt stark vom jeweiligen Experiment ab und wird für jeden spezifischen Fall individuell entschieden. Information über die Medienoptimierung ist erhältlich aus dem Lehrbuch "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Hrsg. P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) S. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Wachstumsmedien lassen sich auch von kommerziellen Anbietern beziehen, wie Standard 1 (Merck) oder BHI (Brain heart infusion, DIFCO) und dergleichen.
25

- Sämtliche Medienkomponenten werden, entweder durch Hitze (20 min bei 1,5 bar und 121°C) oder durch Sterilfiltration, sterilisiert. Die Komponenten können entweder zusammen oder nötigenfalls getrennt sterilisiert werden. Sämtliche Medienkomponenten können zu Beginn der Anzucht zugegen sein oder wahlfrei kontinuierlich oder chargenweise hinzugegeben werden.
30

- Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise zwischen 15°C und 45°C, vorzugsweise bei 25°C bis 40°C und kann während des Experimentes konstant gehalten oder verändert werden. Der pH-Wert des Mediums sollte im Bereich von 5 bis 8,5, vorzugsweise um 7,0 liegen. Der pH-Wert für die Anzucht läßt sich während der Anzucht durch Zugabe von basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure kontrollieren. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel,
40

- wie z. B. Fettsäurepolyglykolester, eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie z. B. Antibiotika, hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen, wie z. B. Umgebungsluft, in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.
- 10 Die so erhaltenen Fermentationsbrühen haben üblicherweise eine Trockenmasse von 7,5 bis 25 Gew.-%.
- Vorteilhaft ist außerdem auch, wenn die Fermentation zumindest am Ende, insbesondere jedoch über mindestens 30% der Fermentationsdauer zuckerlimitiert gefahren wird. Das heißt, dass während dieser Zeit die Konzentration an verwertbarem Zucker im Fermentationsmedium auf 0 bis 3 g/l gehalten, beziehungsweise abgesenkt wird.
- 15 Die Isolierung von biosynthetischen Produkten aus der Fermentationsbrühe und/oder den Mikroorganismen erfolgt in an sich bekannter Weise entsprechend den physikalisch-chemischen Eigenschaften des biosynthetischen Wertprodukts und den biosynthetischen Nebenprodukten.
- 20 Die Fermentationsbrühe kann anschließend beispielsweise weiterverarbeitet werden. Je nach Anforderung kann die Biomasse ganz oder teilweise durch Separationsmethoden, wie z. B. Zentrifugation, Filtration, Dekantieren oder einer Kombination dieser Methoden aus der Fermentationsbrühe entfernt oder vollständig in ihr belassen werden.
- 25 Anschließend kann die Fermentationsbrühe mit bekannten Methoden, wie z. B. mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, oder durch Nanofiltration, eingedickt beziehungsweise aufkonzentriert werden. Diese aufkonzentrierte Fermentationsbrühe kann anschließend durch Gefriertrocknung, Sprühtrocknung, Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren aufgearbeitet werden.
- 30 Es ist aber auch möglich die biosynthetischen Produkte, insbesondere L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin, weiter aufzureinigen. Hierzu wird die produktthaltige Brühe nach dem Abtrennen der Biomasse einer Chromatographie mit einem geeigneten Harz unterworfen, wobei das gewünschte Produkt oder die Verunreinigungen ganz oder teilweise auf dem Chromatographieharz zurückgehalten werden. Diese Chromatographieschritte können nötigenfalls wiederholt werden, wobei die gleichen oder ande-
- 35 40

re Chromatographieharze verwendet werden. Der Fachmann ist in der Auswahl der geeigneten Chromatographieharze und ihrer wirksamsten Anwendung bewandert. Das gereinigte Produkt kann durch Filtration oder Ultrafiltration konzentriert und bei einer Temperatur aufbewahrt werden, bei der die Stabilität des Produktes maximal ist.

5

Die biosynthetischen Produkte können in unterschiedlichen Formen anfallen, beispielsweise in Form ihrer Salze oder Ester.

Die Identität und Reinheit der isolierten Verbindung(en) kann durch Techniken des Standes der Technik bestimmt werden. Diese umfassen Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), spektroskopische Verfahren, Färbeverfahren, Dünnschichtchromatographie, NIRS, Enzymtest oder mikrobiologische Tests. Diese Analyseverfahren sind zusammengefaßt in: Patek et al. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60:133-140; Malakhova et al. (1996) Biotekhnologiya 11 27-32; und Schmidt et al. (1998) Bioprocess Engineer. 19:67-70. Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) Bd. A27, VCH: Weinheim, S. 89-90, S. 521-540, S. 540-547, S. 559-566, 575-581 und S. 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A. et al. (1987) Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17.

20

Die Erfindung wird nun anhand der folgenden nicht-limitierenden Beispiele näher beschrieben:

25

Beispiel 1

Konstruktion von Plasmid pCIS lysC

Im ersten Schritt der Stammkonstruktion wurde ein allelischer Austausch des lysC Wildtypgens in *Corynebakterium glutamicum* ATCC13032 durchgeführt. Dabei wurde im lysC Gen ein Nukleotidaustausch durchgeführt, so daß im resultierenden Protein die Aminosäure Thr an der Position 311 durch ein Ile ausgetauscht wurde. Ausgehend von der chromosomalen DNA aus ATCC13032 als Template für eine PCR Reaktion wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:5 und SEQ ID NO:6 lysC mit Hilfe des Pfu-Turbo PCR Systems (Stratagene USA) nach Angaben des Herstellers amplifiziert.

35

SEQ ID NO:5

5'-GAGAGAGAGACGCGTCCCAGTGGCTGAGACGCATC -3'

SEQ ID NO:6

40

5'-CTCTCTCTGTCGACGAATTCAATCTTACGGCCTG-3'

- Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpa-
 5 riert. Das amplifizierte Fragment wird an seinem 5'-Ende von einem Sall Restriktions-
 schnitt und an seinem 3'-Ende von einem MluI Restriktionsschnitt flankiert. Vor der
 Klonierung wurde das amplifizierte Fragment durch diese beiden Restriktionsenzyme
 verdaut und mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharma-
 cia, Freiburg) aufgereinigt.
- 10 Das erhaltenen Polynukleotid wurde über die Sall und MluI Restriktionsschnitte in
 pCLIK5 MCS integrativ SacB im folgenden pCIS genannt (SEQ ID NO: 7) kloniert und
 in *E. coli* XL-1 blue transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde
 durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955,
 Virology, 1:190) erreicht. Das Plasmid wurden isoliert und durch Sequenzierung die
 15 erwartete Nukleotidsequenz bestätigt. Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach
 Methoden und mit Materialien der Fa. Quiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktio-
 nen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sci-
 ences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI
 Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet. Das
 20 erhaltene Plasmid pCIS lysC ist als SEQ ID NO:8 aufgeführt.

Beispiel 2

Mutagenese des lysC Gens aus *C. glutamicum*

- 25 Die gerichtete Mutagenese des lysC Gens aus *C. glutamicum* wurde mit dem Quick-
 Change Kit (Fa. Stratagene/USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die
 Mutagenese wurde im Plasmid pCIS lysC, SEQ ID NO:8 durchgeführt. Für den Aus-
 tausch von thr 311 nach 311ile mit Hilfe der Quickchange Methode (Stratagene) wur-
 den folgende Oligonukleotidprimer synthetisiert:

30

SEQ ID NO:9

5'-CGGCACCACCGACATCATCTTCACCTGCCCTCGTTCCG -3'

SEQ ID NO:10

35

5'-CGGAACGAGGGCAGGTGAAGATGATGTCGGTGGTGCCG -3'

- Der Einsatz dieser Oligonukleotidprimer in der Quickchange Reaktion führt in dem lysC
 Gen SEQ ID NO:11 zu einem Austausch des Nukleotids in Position 932 (von C nach
 T). Der resultierende Aminosäureaustausch Thr311Ile im lysC Gen wurde nach Trans-
 40 formation in *E. coli* XL1-blue und Plasmidpräparation durch ein Sequenzierungsreaktio-

nen bestätigt. Das Plasmid erhielt die Bezeichnung pCIS lysC thr311ile und ist als SEQ ID NO:12 aufgeführt.

Das Plasmid pCIS lysC thr311ile wurde in *C. glutamicum* ATCC13032 mittels Elektroporation wie bei Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303 beschrieben, transformiert. Modifikationen des Protokolls sind in DE 10046870 beschrieben. Die chromosomale Anordnung des lysC-Lokus einzelner Transformanten wurde mit Standardmethoden durch Southernblot und Hybridisierung wie in Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben, überprüft. Dadurch wurde sichergestellt, daß es sich bei den Transformanten um solche handelt, die das transformierte Plasmid durch homologe Rekombination am lysC-Lokus integriert haben. Nach Wachstum solcher Kolonien über Nacht in Medien, die kein Antibiotikum enthalten, werden die Zellen auf ein Saccharose-CM-Agarmedium (10% Saccharose, 10 g/l Glucose; 2,5 g/l NaCl; 2 g/l Harnstoff, 10 g/l Bacto Peptone (Fa. Difco); 10 g/l Hefeextrakt, 22,0 g/L Agar (Difco)) ausplattiert und bei 30°C für 24 Stunden inkubiert.

Da das im Vektor pCIS lysC thr311ile enthaltende sacB Gen Saccharose in ein toxisches Produkt umwandelt, können nur solche Kolonien anwachsen, die das sacB Gen durch einen zweiten homologen Rekombinationsschritt zwischen dem Wildtyp lysC Gen und dem mutierten Gen lysC thr311ile deletiert haben. Während der homologen Rekombination kann entweder das Wildtyp Gen, oder das mutierte Gen zusammen mit dem sacB Gen deletiert werden. Wenn das sacB Gen zusammen mit dem Wildtyp Gen entfernt wird, resultiert eine mutierte Transformante.

Anwachsende Kolonien wurden gepickt, und auf eine Kanamycin-sensitiven Phänotyp hin untersucht. Klone mit deletiertem SacB Gen müssen gleichzeitig Kanamycin sensitives Wachstumsverhalten zeigen. Solche Kan-sensitiven Klone wurde im einem Schüttelkolben auf ihre Lysin-Produktivität hin untersucht (siehe Beispiel 6). Zum Vergleich wurde der nicht behandelte *C. glutamicum* ATCC13032 angezogen. Klone mit einer gegenüber der Kontrolle erhöhten Lysin-Produktion wurden selektiert, chromosomale DNA gewonnen und der entsprechende Bereich des lysC Gens durch eine PCR-Reaktion amplifiziert und sequenziert. Ein solcher Klon mit der Eigenschaft erhöhter Lysin-Synthese und nachgewiesener Mutation in lysC an der Stelle 932 wurde mit ATCC13032 lysC^{fbr} bezeichnet.

Beispiel 3

Herstellung eines Integrationsplasmids zur Überexpression des lysC-Gens mit Hilfe der heterologen Expressionseinheit Psod (SEQ. ID. NO. 2)

Zur Amplifizierung der Expressionseinheit des Gens, das für die Superoxiddismutase kodiert, wurden die folgenden Oligonukleotide definiert.

SEQ ID 13:

5 sod8: 5'- accctggcggaaaccctgagtcg -3'

SEQ ID 14:

sod1: 5'- tacgaccagggccacgggtaaaaaatccttcgtaggttccgcaccgagcatatacatcttttg-3'

10 Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC 13032 eingesetzt. Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 657 bp entsprach.

15 Zur Amplifizierung des Gens, das für die Aspartokinase kodiert, wurden die folgenden Oligonukleotide definiert.

SEQ ID 15

lysC2: 5'- cctacgaaaggatttttaccctgtggccctggctacag-3'

20 SEQ ID 16:

lysC6: 5'- gattagtggaaacctcgtcgtc-3'

25 Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC13032 lysC^{fr} eingesetzt. Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 1638 bp entsprach.

Die Primer sod1 und ask2 enthalten eine überlappende Sequenz und sind an ihren 5'-Enden homolog zueinander.

30 Die oben erhaltenen PCR-Produkte wurden als Template für eine weitere PCR eingesetzt, in der die folgenden Primer genutzt wurden.

SEQ ID 17:

35 sod4: 5'- gcggcgcaggattttctaa-3'

SEQ ID 18:

lysC4: 5'- tcggtgcctgagtaattgtctt-3'

40 Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 1811 bp entsprach. Diese Psod/lysC-Fusion wurde dann in den Vektor

pCR2.1 (Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) kloniert. In einem weiteren Schritt wurde die Fusion Psod/lysC aus dem Plasmid pCR2.1 (Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) als 1773 bp EcoRI-Fragment in den Integrationsvektor pK19 mob sacB SEQ ID NO 19 kloniert, der zuvor mit der Restriktionsendonuklease EcoRI geschnitten worden war. Das resultierende Plasmid wurde mit pk19 mob sacB Psod lysC bezeichnet.

Zur Amplifikation eines 5'-Bereiches des lysC-Gens wurden folgende Oligonukleotide definiert:

10 SEQ ID 20:

lysC23: 5'- caccgcggccttggacatcactgctac-3'

SEQ ID 21:

lysC24: 5'- cctggggccttagcggatgcgtctca-3'

15

Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* eingesetzt. Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 674 bp entsprach. Dieses DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) kloniert. Ein 787 bp

20 Spel/XbaI-Fragment wurde dann anschließend in den Vektor pK19 mob sacB Psod lysC kloniert, der zuvor mit dem Restriktionsenzym NheI verdaut worden war. Das resultierende Plasmid wurde mit pK19 mob sacB Psod lysC + US (SEQ ID 22) bezeichnet. Bis zu diesem Schritt wurden alle Klonierungen in *Escherichia coli* XL-1 Blue (Firma Stratagene, Amsterdam, Niederlande) durchgeführt.

25

Mit dem Transformationsplasmid pK19 mobsacB Psod lysC + US wurde dann *E. coli* Mn522 (Firma Stratagene, Amsterdam, Niederlande) zusammen mit dem Plasmid pTc15AcgIM nach Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303 transformiert. Das Plasmid pTc15AcgIM ermöglicht die Methylierung von DNA nach dem

30 Methylierungsmuster von *Corynebacterium glutamicum* (DE 10046870). Durch diesen Schritt wird eine anschließende Elektroporation von *Corynebacterium glutamicum* mit dem Integrationsplasmid pK19 mob sacB Psod lysC + US ermöglicht. Aus dieser Elektroporation und der nachfolgenden Selektion auf CM-Platten mit Kanamycin (25 µg/ml) wurden mehrere Transkonjuganten erhalten. Zur Selektion auf das zweite Re-

35 kombinationsereignis, das zur Excision des Vectors samt dem lysC-Promotor und dem lysC-Gen führen soll, wurden diese Transkonjuganten in CM-Medium über Nacht ohne Kanamycin angezogen und anschließend zur Selektion auf CM-Platten mit 10% Saccharose ausplattiert. Das auf dem Vektor pK19 mob sacB vorhandenen sacB-Gen kodiert für das Enzym Laevansucrase und führt bei Wachstum auf Saccharose zur Synthese von Laevan. Da Laevan für *C. glutamicum* toxisch ist, können nur *C. glutamicum*

40

Zellen, die das Integrationsplasmid durch den zweiten Rekombinationsschritt verloren haben, auf Saccharose-haltigem Medium wachsen (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174 (1992) 5462-5466). 100 Saccharose-resistente Klone wurden auf ihre Kanamycin-Sensitivität hin überprüft. Für 57 der getesteten Klone konnte neben der Resistenz gegenüber Saccharose auch eine Sensitivität gegenüber Kanamycin nachgewiesen werden. Ob auch der gewünschte Austausch der natürlichen Expressionseinheit durch die Psod-Expressionseinheit erfolgt war, wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) überprüft. Für diese Analyse wurde chromosomale DNA aus dem Ausgangsstamm und 20 Klonen isoliert. Hierzu wurden die jeweiligen Klone mit einem Zahnstocher von der Agarplatte abgenommen und in 100 µl H₂O suspendiert und 10 min bei 95°C aufgeköcht. Jeweils 10 µl der erhaltenen Lösung wurden als Template in die PCR eingesetzt. Als Primer wurden Oligonukleotide verwendet, die zur Psod-Expressionseinheit und dem lysC-Gen homolog sind. Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt: Vorabdenaturierung: 5 min bei 95°C; Denaturierung 30 sec bei 95°C; Hybridisierung 30 sec bei 55°C; Amplifizierung 2 min bei 72°C; 30 Zyklen; End-Extension 5 min bei 72°C. Im Ansatz mit der DNA des Ausgangsstammes konnte durch Wahl der Oligonukleotide kein PCR-Produkt entstehen. Nur bei Klonen, die durch die 2. Rekombination den Austausch des natürlichen Promotors (PlysC) gegen Psod vollzogen haben, wurde ein Bande mit einer Größe von 340 bp erwartet. Insgesamt waren von den getesteten 20 Klonen 2 Klone positiv.

Beispiel 4

Aspartokinase (lysC) Assay

C. glutamicum Stämme, die entweder eine chromosomale Copy des lysC^{fbr}-Gens mit dem natürlichen Promotor oder eine chromosomale Copie des Psod lysC^{fbr} Konstruktes enthielten, wurden in MMA-Medium (20 g/l Glucose, 10 g/l (NH₄)₂SO₄, 0,5 g KH₂PO₄, 0,5 g K₂HPO₄, 2,5 g Harnstoff, 5 g NaCl, 400 mg MgSO₄ + 7H₂O, 10 mg FeSO₄ * 7H₂O, MnSO₄ * 6 H₂O, 100 mg L-Leucin, 100 mg L-Cystein, 250 mg Pantothersäure, 5 mg Nicotinamid, 100 µg Biotin, 200 µg Thiamin, 15 g MOPS, pH 6,8) bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 8 angezogen. Die Zellen wurden bei 4°C abzentrifugiert und das zweimal mit kaltem Tris-HCl-Puffer (0,1%, pH 8,0) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in kaltem Tris-HCl-Puffer (0,1%, pH 8,0) aufgenommen und eine OD₆₀₀ von 160 eingestellt. Für den Zellaufschluß wurden 1 ml dieser Zellsuspension in 2 ml Ribolyserröhrchen der Fa. Hybaid überführt und in einem Ribolyser der Fa. Hybaid bei einer Rotationseinstellung von 6,0 dreimal für jeweils 30 sec lysiert. Das Lysat wurde durch 30minütige Zentrifugation bei 15.000 rpm bei 4°C in einer Eppendorffzentrifuge geklärt und der Überstand in ein neues Eppendorffcup überführt. Der Proteingehalt wurde nach Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72:248-254 bestimmt.

Die enzymatische Aktivität der Aspartokinase wurde wie folgt durchgeführt. Reaktionsansätze von 1 ml mit 100 mM Tris-HCl (pH8,0), 10 mM MgCl₂, 600 mM Hydroxylamin-HCl (pH 7,3,0 mit 10 N KOH), 4 mM ATP, 200 mM Aspartat (Natriumsalz) und H₂O ad 1 ml wurden für 10 min bei 30°C inkubiert. Der Test wurde durch Zugabe von dem jeweiligen Proteinlysate gestartet und bei 30°C für 30 min inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 1 ml der Stoplösung (10% Eisenchlorid, 3,3 % Trichloressigsäure, 0,7 N NaCl) zum Reaktionsgemisch hinzugegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde OD₅₄₀ des Überstandes gemessen. 1 Unit entspricht dabei 1 nmol Aspartat Hydroxamat, das pro mg Protein pro Minute gebildet wird.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1a gezeigt.

Tabelle 1a

15

Stamm	spezifische Aktivität [nmol/mg/min]
ATCC 13032 lysC ^{fab}	19,35
ATCC 13032 Psod lysC ^{fab}	41,22

Die Aktivität der Aspartokinase konnte durch die Integration des Psod lysC Konstruktes in das Chromosom verdoppelt werden.

20 Beispiel 5
Produktion von Lysin

Zur Untersuchung der Auswirkung des Psod lysC Konstruktes auf die Lysin-Produktion wurde der Stamm ATCC13032, ATCC13032 lysC^{fab} und ATCC13032 Psod lysC^{fab} auf CM-Platten (10,0 g/L D-glucose, 2,5 g/L NaCl, 2,0 g/L Harnstoff, 10,0 g/L Bacto Pepton (Difco), 5,0 g/L Yeast Extract (Difco), 5,0 g/L Beef Extract (Difco), 22,0 g/L Agar (Difco), autoklaviert (20 min. 121°C)) für 2 Tag bei 30°C angezogen. Anschließend wurden die Zellen von der Platte abgekratzt und in Saline resuspendiert. Für die Hauptkultur wurden 10 ml Medium I und 0,5 g autoklaviertes CaCO₃ (Riedel de Haen) in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit der Zellsuspension bis zu einer OD₆₀₀ von 1,5 beimpft und für 39h auf einem vom Typ Infors AJ118 (Fa. Infors, Bottmingen, Schweiz) bei 220 upm inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration des in das Medium ausgeschiedene Lysin bestimmt.

35 Medium I:
40g/l Saccharose

- 60g/l Melasse (auf 100% Zuckergehalt berechnet)
10g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
0.4g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0.6g/l KH_2PO_4
5 0.3mg/l Thiamin*HCl
1mg/l Biotin (aus einer 1 mg/ml steril filtrierten Stammlösung die mit NH_4OH auf pH 8,0 eingestellt wurde)
2mg/l FeSO_4
2mg/l MnSO_4
10 mit NH_4OH auf pH 7,8 eingestellt, autoklaviert (121°C, 20 min).
zusätzlich wird Vitamin B12 (Hydroxycobalamin Sigma Chemicals) aus einer Stammlösung (200 µg/ml, steril filtriert) bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/l zugegeben

- Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie nach Agilent auf einer Agilent 1100 Series LC System HPLC.
15 Eine Vorsäulenderivatisierung mit Ortho-Pthalaldehyd erlaubt die Quantifizierung der gebildeten Aminosäuren, die Auftrennung des Aminosäuregemisch findet auf einer Hypersil AA-Säule (Agilent) statt.

Das Ergebnis der Untersuchung ist in Tabelle 2a dargestellt

20

Tabelle 2a

Stamm	L-Lysin (g/l)
ATCC13032	0
ATCC13032 lysC^{fbr}	10,15
ATCC13032 Psod lysC^{fbr}	12,67

Beispiel 6

- 25 Herstellung des Vektors pCLiK5MCS

Zunächst wurden Ampicillinresistenz und Replikationsursprung des Vektors pBR322 mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:23 und SEQ ID NO:24 mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert.

30

SEQ ID NO:23

5'-CCCGGGATCCGCTAGCGGCGCGCCGGCCGGCCCGGTGTGAAATACCGCACA
G-3'

- 35 SEQ ID NO:24

5'-TCTAGACTCGAGCGGCCGCGGCCGCGCCTTTAAATTGAAGACGAAAGGGCCTC
G-3'

5 Neben den zu pBR322 komplementären Sequenzen, enthält der Oligonukleotidprimer
SEQ ID NO:23 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen
SmaI, BamHI, NheI und Ascl und der Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:24 in 5'-3'
Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen XbaI, XhoI, NotI und
DraI. Die PCR Reaktion wurde nach Standardmethode wie Innis et al. (PCR Protocols.
A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Poly-
10 merase (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit
einer Größe von ungefähr 2,1 kb wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Puri-
fication Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt.
Die stumpfen Enden des DNA-Fragmentes wurden mit dem Rapid DNA Ligation Kit
(Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers miteinander ligiert und
15 der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Clo-
ning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben (1989)), in kompetente
E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid
tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Ampicillin (50µg/ml) haltigen LB
Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

20 Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit
(Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus
überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK1.

25 Ausgehend vom Plasmid pWLT1 (Liebl et al., 1992) als Template für eine PCR Reakti-
on wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:25 und SEQ ID NO:26 eine Ka-
namycin-Resistenzcassette amplifiziert.

SEQ ID NO:25:

30 5'-GAGATCTAGACCCGGGGATCCGCTAGCGGGCTGCTAAAGGAAGCGGA-3'

SEQ ID NO:26

5'-GAGAGGCGCGCCGCTAGCGTGGGCGAAGAACTCCAGCA-3'

35 Neben den zu pWLT1 komplementären Sequenzen, enthält der Oligonukleotidprimer
SEQ ID NO: 25 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen
XbaI, SmaI, BamHI, NheI und der Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:26 in 5'-3' Richtung
die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen Ascl und NheI. Die PCR Reaktion
wurde nach Standardmethode wie Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and
40 Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla,

USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 1,3 kb wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Das DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und AscI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und im Anschluß daran erneut mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Der Vektor pCLiK1 wurde ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und AscI geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 2,1kb) mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem geschnittenen PCR Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Ampicillin (50µg/ml) und Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK2.

Der Vektor pCLiK2 wurde mit der Restriktionsendonuklease DraI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde ein ca. 2,3 kb großes Vektorfragment mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers religiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK3.

Ausgehend vom Plasmid pWLQ2 (Liebl et al., 1992) als Template für eine PCR Reaktion wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:27 und SEQ ID NO:28 der Replikationsursprung pHM1519 amplifiziert.

5 SEQ ID NO:27:

5'-GAGAGGGCGGCCGCGCAAAGTCCCGCTTCGTGAA-3'

SEQ ID NO:28:

5'-GAGAGGGCGGCCGCTCAAGTCGGTCAAGCCACGC-3'

10

Neben den zu pWLQ2 komplementären Sequenzen, enthalten die Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:27 und SEQ ID NO:28 Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease NotI. Die PCR Reaktion wurde nach Standardmethode wie Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 2,7 kb wurde mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Das DNA-Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease NotI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und im Anschluß daran erneut mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Der Vektor pCLiK3 wurde ebenfalls mit der Restriktionsendonuklease NotI geschnitten und mit alkalischer Phosphatase I (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 2,3kb) mit dem

20 GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem geschnittenen PCR Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

35 Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK5.

Für die Erweiterung von pCLiK5 um eine „multiple cloning site“ (MCS) wurden die beiden synthetischen, weitestgehend komplementären Oligonukleotide SEQ ID NO:29 und SEQ ID NO:30, die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen SwaI, XhoI, AatI, ApaI, Asp718, MluI, NdeI, SpeI, EcoRV, SalI, ClaI, BamHI, XbaI und SmaI enthalten, durch gemeinsames Erhitzen auf 95°C und langsames Abkühlen zu einem doppelsträngigen DNA-Fragment vereinigt.

SEQ ID NO:29:

5'-TCGAATTTAAATCTCGAGAGGCCTGACGTCGGGCCCCGGTACCACGCGTCATAT
GACTAGTTCGGACCTAGGGATATCGTCGACATCGATGCTCTTCTGCGTTAATTAAC
AATTGGGATCCTCTAGACCCGGGATTAAAT-3'

SEQ ID NO:30:

5'-GATCATTAAATCCCGGGTCTAGAGGATCCCAATTGTTAATTAACGCAGAAGAG
CATCGATGTCGACGATATCCCTAGGTCCGAAGTAGTCATATGACGCGTGGTACCG
GGCCCGACGTCAGGCCTCTCGAGATTAAAT-3'

Der Vektor pCLiK5 wurde mit den Restriktionsendonuklease XhoI und BamHI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 5,0 kb) mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem synthetischen Doppelsträngigen DNA-Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK5MCS.

Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS ist als SEQ ID NO:31 aufgeführt.

Beispiel 7

Herstellung des Plasmids PmetA metA

5

Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpariert. Mit den Oligonukleotidprimer SEQ ID NO 32 und SEQ ID NO 33, der chromosomalen DNA als Template und Pfu Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) wurde mit Hilfe
10 der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Standardmethoden, wie in Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press beschrieben, ein das metA Gen inklusive des nichkodierenden 5'-Bereichs amplifiziert.

SEQ ID NO 32

15 5'-GCGCGGTACCTAGACTCACCCCAGTGCT -3'

und

SEQ ID NO 33

5'-CTCTACTAGTTTAGATGTAGAACTCGATGT -3'

20 Das erhaltene DNA Fragment von ca. 1,3 kb Größe wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Im Anschluß daran wurde es mit den Restriktionsenzymen Asp718 und SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten und das DNA Fragment mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit aufgereinigt.

25

Der Vektor pCLiK5MCS SEQ ID NO: 31 wurde mit den Restriktionsenzymen Asp718 und SpeI geschnitten und ein 5 kb großes Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit isoliert.

30 Das Vektorfragment wurde zusammen mit dem PCR-Fragment mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente *E.coli* XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid
35 tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Quiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977)
40 Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt.

Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS PmetA metA ist als SEQ ID NO 34: aufgeführt.

5

Beispiel 8

Herstellung des Plasmids pCLiK5MCS Psod metA

- 10 Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpa-
- riert. Mit den Oligonukleotidprimer SEQ ID NO 35 und SEQ ID NO 36, der chromoso-
- malen DNA als Template und Pfu Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) wurde mit Hilfe
- der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Standardmethoden wie Innis et al. (1990)
- 15 PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press ein DNA Frag-
- ment von ca. 200 Basenpaaren aus dem nichtkodierenden 5'-Bereich (Region der Ex-
- pressionseinheit) der Superoxiddismutase (Psod) amplifiziert.

SEQ ID NO 35

- 20 5'-GAGACTCGAGAGCTGCCAATTATTCCGGG-3'

und

SEQ ID NO 36

5'-CCTGAAGGCGCGAGGGTGGGCATGGGTAAAAAATCCTTTTCG -3'

- 25 Das erhaltene DNA Fragment wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purifica-
- tion Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

Ausgehend vom Plasmid PmetA metA SEQ ID 34 als Template für eine PCR Reaktion

wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO 37: und SEQ ID NO 38: ein Teil von

30 metA amplifiziert.

SEQ ID NO 37

5'-CCCACCCTCGCGCCTTCAG -3'

und

- 35 SEQ ID NO 38

5'-CTGGGTACATTGCGGCCC -3'

- Das erhaltene DNA Fragment von ungefähr 470 Basenpaaren wurde mit dem
- GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit nach Angaben des Herstellers gerei-
- 40 nigt.

- In einer weiteren PCR Reaktion wurden die beiden oben erhaltenen Fragmente gemeinsam als Template eingesetzt. Durch die mit dem Oligonukleotidprimer SEQ ID NO: 36 eingebrachten, zu metA homologen Sequenzen, kommt es im Zuge der PCR-Reaktion zu einer Anlagerung beider Fragmente aneinander und einer Verlängerung zu einem durchgehenden DNA-Strang durch die eingesetzte Polymerase. Die Standardmethode wurde dahingehend modifiziert, dass die verwendeten Oligonukleotidprimer SEQ ID NO: 35 und SEQ ID NO: 38 erst mit Beginn des 2. Zykluses dem Reaktionsansatz zugegeben wurden.
- Das amplifizierte DNA Fragment von ungefähr 675 Basenpaaren wurde mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt. Im Anschluß daran wurde es mit den Restriktionsenzymen XhoI und NcoI (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das ca. 620 Basenpaar große DNA Fragment mit GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) aus der Agarose aufgereinigt. Das Plasmid PmetA metA SEQ ID NO 34: wurde mit den Restriktionsenzymen NcoI und SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurde ein ca. 0,7 kb großes metA Fragment mit GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit aus der Agarose aufgereinigt.
- Der Vektor pClik5MCS SEQ ID NO: 31 wurde mit den Restriktionsenzymen XhoI und SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim) geschnitten und ein 5 kb großes Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung mit GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit isoliert.
- Das Vektorfragment wurde zusammen mit dem PCR-Fragment und dem metA-Fragment mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.
- Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Qiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS PSODmetA ist als SEQ ID NO 39: aufgeführt.

Beispiel 9
MetA-Aktivitäten

5
Der Stamm Corynebacterium glutamicum ATCC13032 wurde jeweils mit den Plasmi-
den pClik5 MCS, pClik MCS PmetA metA, pCLiK5MCS Psod metA, nach der be-
schriebenen Methode (Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303)
transformiert. Die Transformationsmischung wurde auf CM-Platten plattiert, die zusätz-
10 lich 20mg/l Kanamycin enthielten, um eine Selektion auf Plasmid-haltige Zellen zu er-
reichen. Erhaltene Kan-resistente Klone wurden gepickt und vereinzelt.

C. glutamicum Stämme, die eines dieser Plasmidkonstrukte enthielten, wurden in
MMA-Medium ((40 g/l Saccharose, 20 g/l (NH₄)₂SO₄, 1 g/l KH₂PO₄, 1 g/l K₂HPO₄,
15 0,25g/l MgSO₄ x 7H₂O, 54 g Aces, 1 ml CaCl₂ (10 g/l), 1 ml Protocatechoat (300 mg/10
ml), 1 ml Spurenelementelösung (10 g/l FeSO₄ x /H₂O, 10 g/l MnSO₄ x H₂O, 2 g/l
ZnSO₄ x 7 H₂O, 0,2 g/l CuSO₄, 0,02 g/l NiCl₂ x 6 H₂O), 100 µg/l Vitamin B₁₂, 0,3 mg/l
Thiamin, 1mM Leucin, 1 mg/l Pyridoxal HCl, 1 ml Biotin (100 mg/l), pH7,0) bei 30°C
über Nacht angezogen. Die Zellen wurden bei 4°C abzentrifugiert und das zweimal mit
20 kaltem Tris-HCl-Puffer (0,1%, pH 8,0) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wur-
den die Zellen in kalten Tris-HCl-Puffer (0,1%, pH 8,0) aufgenommen und eine OD₆₀₀
von 160 eingestellt. Für den Zellaufschluß wurden 1 ml dieser Zellsuspension in 2 ml
Ribolyserröhrchen der Fa. Hybaid überführt und in einem Ribolyser der Fa. Hybaid
bei einer Rotationseinstellung von 6,0 dreimal für jeweils 30 sec lysiert. Das Lysat wur-
25 de durch 30minütige Zentrifugation bei 15.000 rpm bei 4°C in einer Eppendorfcup-
ge geklärt und der Überstand in ein neues Eppendorfcup überführt. Der Proteingehalt
wurde nach Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72:248-254 bestimmt.

Die Messung der enzymatischen Aktivität von MetA wurde wie folgt durchgeführt. Die
30 Reaktionsansätze von 1 ml enthielten 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5), 5mM
MgCl₂, 100 µM Acetyl CoA, 5mM L-Homoserine, 500 µM DTNB (Ellmans Reagenz)
und Zellextrakt. Der Test wurde durch Zugabe von dem jeweiligen Proteinlysate gestar-
tet und bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde dann eine Kinetik bei 412 nm über 10
min aufgenommen.

35
Die Ergebnisse sind in Tabelle 3a gezeigt.

Tabelle 3a

Stamm	spezifische Aktivität
-------	-----------------------

	[nMol/mg/min]
ATCC 13032 pClik5MCS	12,6
ATCC 13032 pClik5MCS PmetA metA	50,7
ATCC 13032 pClik5MCS Psod metA	100,7

Die Aktivität von MetA konnte durch die Verwendung der heterologen Expressionseinheit Psod erheblich gesteigert werden.

Patentansprüche

1. Verwendung einer Nukleinsäure mit Promotoraktivität, enthaltend
- 5 A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
 B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist oder
- 10 C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
 D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C)
- zur Transkription von Genen.
- 15
2. Verwendung einer Expressionseinheit, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 und zusätzlich funktionell verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet, zur Expression von Genen.
- 20
3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Expressionseinheit enthält:
- E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
- 25 F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder
 G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- 30 H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G).
4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Expressionseinheit aus einer Nukleinsäure der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 besteht.
- 35
5. Nukleinsäure mit Promotoraktivität, enthaltend
- A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
 B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 %

- auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist
oder
- 5 C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C),
- mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1
ausgenommen ist.
- 10 6. Expressionseinheit, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 5 und zusätzlich funktionell verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet.
- 15 7. Expressionseinheit nach Anspruch 6, enthaltend
- E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder
- 20 G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G),
- mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2
25 ausgenommen ist.
8. Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch
- 30 a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp oder
- 35 b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.
- 40

- 5 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man
- 10 b1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 15 b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 20 b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 25 10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp
- 30 ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder
- 35 bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.
- 40 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit

Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

- 5 bh1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit
10 erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß
15 Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
20
12. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Reduzierung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp
25
- ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder
30
- br) Nukleinsäuren mit reduzierter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription endogene Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.
35
13. Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch

- 5 c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp oder
- 10 d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.
- 15 14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man
- 20 d1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten erfolgt oder
- 25 d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 30 d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 35 15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp
- 40 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der

endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

- 5 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.
- 10 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man
- 15 dh1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 20 dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 25 dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 30 17. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Reduzierung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp
- 35 cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen, Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der

endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder

- 5 dr) Expressionseinheiten mit reduzierter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform cr) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.
- 10 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.
- 15 20
- 25 19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Methylentetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-
- 30 35 40

- 5 Synthase, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase.
- 10
20. Expressionskassette, umfassend
- a) mindestens eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 und
- 15 b) mindestens eine weitere, zu exprimierende Nukleinsäuresequenz, und
- c) gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente,
- 20 wobei mindestens eine Expressionseinheit und eine weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft sind und die weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.
- 25 21. Expressionskassette nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die weitere, zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren,
- 30 Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen
- 35

22. Expressionskassette nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Methylene-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthase I, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serin-hydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase
23. Expressionsvektor enthaltend eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 20 bis 22.
24. Genetisch veränderter Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch
- a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription mindestens eines endogenen Gens reguliert oder

- 5 b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.
- 10 25. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man
- 15 b1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 20 b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 25 b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 30
- 35 26. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 24 oder 25 mit erhöhter oder verursachter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet, dass
- 40 ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist oder

5 bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform ah) reguliert wird, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

10 27. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

15 bh1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

20 bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

25 bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

30 28. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 24 oder 25 mit reduzierter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet dass,

35 ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von mindestens einem, endogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder

40

5 br) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit reduzierter Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass die Transkription mindestens eines endogenen Gens unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.

10 29. Genetisch veränderter Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch

15 c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression mindestens eines endogenen Gens reguliert, im Vergleich zum Wildtyp oder

20 d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

25 30. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

30 d1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

35 d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

40

d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressions-
einheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifi-
scher Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu
exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

5

31. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 29 oder 30 mit erhöh-
ter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich
zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet, dass man

10

ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens
einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die
Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp er-
höht oder

15

dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinhei-
ten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß
Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß
Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressi-
onseinheiten heterolog sind.

20

32. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 31, dadurch gekenn-
zeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus
durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressi-
onseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressions-
aktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

25

dh1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, ge-
gebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom
des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder meh-
rerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressi-
onseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter
spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

30

dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so
dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter
der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2
oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, er-
folgt oder

35

dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

5

33. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 29 oder 30 mit reduzierter Expressionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet dass,

10

cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression von mindestens einem endogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder

15

dr) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit reduzierter Expressionsaktivität in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass die Expression mindestens eines Gens unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.

20

34. Genetisch veränderter Mikroorganismus, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 und funktionell verknüpft ein zu exprimierendes Gen, wobei das Gen im Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

25

35. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 34, enthaltend eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 20 bis 22.

30

36. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 24 bis 35, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein

40

aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

- 5 37. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, 10 Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthase I, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, 25 Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase.
- 30 38. Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24 bis 37.
- 35 39. Verfahren zur Herstellung von Lysin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24, 25, 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat- 40

- Decarboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydrodipicolinate-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydridipicolinate-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat-Isomerase, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LuxR, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR1, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR2, Nukleinsäuren kodierend eine Malat-Quinon-Oxodoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend einen Lysin Exporter, Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, Nukleinsäuren kodierend eine Arginyl-t-RNA-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein Protein OPCA, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase und Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphofructokinase,
40. Verfahren nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat-Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat-Decarboxylase-Aktivität, Dihydrodipicolinate-Synthetase-Aktivität, Dihydridipicolinate-Reduktase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat-Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat-Isomerase-Aktivität, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LuxR, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LysR1, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LysR2, Malat-Quinon-Oxodoreduktase-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase-Aktivität, Transketolase-Aktivität, Transaldolase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Arginyl-t-RNA-Synthetase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Fruktose-1,6-bisphosphatase-Aktivität, Protein OPCA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität, 6-Phosphofructokinase-Aktivität und Biotin-Ligase-Aktivität aufweisen.
41. Verfahren nach Anspruch 39 oder 40, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der

- Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Homoserine-Kinase-Aktivität, Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität, Threonin-Exporter-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-Decarboxylase-Aktivität und Threonin-Synthase-Aktivität aufweisen.
- 5
42. Verfahren zur Herstellung von Methionin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24, 25, 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin O-Acetyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-gamma-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-beta-Lyase, Nukleinsäuren kodierend eine Serin-Hydroxymethyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Nukleinsäuren kodierend eine Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Aminotransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Phosphatase, Nukleinsäuren kodierend eine Serine Acetyl-Transferase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase I, Nukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase II, Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Sulfat-Adenylyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Reductase, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin-Sulfit-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin NADPH-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Nukleinsäuren kodierend einen RXA0655 Regulator und Nukleinsäuren kodierend einen RXN2910 Regulator.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
43. Verfahren nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Ho-
- 40

- 5 moserin Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Cystahionin-gamma-Synthase-Aktivität, Cystahionin-beta-Lyase-Aktivität Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase-Aktivität, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase-Aktivität, Phosphoserin-Aminotransferase-Aktivität, Phosphoserin-Phosphatase-Aktivität, Serin Acetyl-Transferase-Aktivität, Cystein-Synthase Aktivität I-Aktivität, Cystein-Synthase Aktivität II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Coenzym 10 B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfat-Adenylyltransferase-Aktivität, Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Reductase-Aktivität, Ferredoxin-Sulfit-Reduktase-Aktivität, Ferredoxin NADPH-Reduktase Aktivität, Ferredoxin-Aktivität, Aktivität Proteins der Sulfat-Reduktion RXA077, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA248, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA247, Aktivität eines RXA655-Regulators und Aktivität eines RXN2910-Regulators aufweisen.
- 15
44. Verfahren nach Anspruch 42 oder 43, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine 20 reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Homoserine-Kinase-Aktivität, Threonin-Dehydratase-Aktivität, Threonin Synthase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität und 25 Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.
45. Verfahren zur Herstellung von Threonin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24, 25, 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine 30 Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Threonin Synthase, Nukleinsäuren kodierend einen Threonin Exporter Carrier, Nukleinsäuren kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, , 35 Nukleinsäuren kodierend einer Malat-Quinon-Oxidoreductase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend
- 40

- einen Lysin-Exporter, Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, , Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend ein Threonin Efflux-Protein, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein OpcA Protein, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphofructokinase, und Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-Dehydrogenase
- 5
46. Verfahren nach Anspruch 45, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Threonin Synthase-Aktivität, Aktivität eines Threonin Export-Carriers, Transaldolase-Aktivität, Transketolase-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase-Aktivität, Malat-Qinon-Oxidoreductase-Aktivität, Homoserin-Kinase-Aktivität, Biotin-Ligase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Protein OpcA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität, 6-Phosphofructokinase-Aktivität, Fruktose 1,6 bisphosphatase-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität aufweisen.
- 10
- 15
- 20
47. Verfahren nach Anspruch 45 oder 46, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthetase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-Decarboxylase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Acetolactat-Synthase-Aktivität , Ketol-Aid-Reductoisomerase- Aktivität, Branched chain aminotransferase- Aktivität, Coenzym B12-abhängige Methionin Synthase- Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methion Synthase-Aktivität, Dihydroxy-acid Dehydratase- Aktivität und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.
- 25
- 30
- 35
48. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 bis 47, dadurch gekennzeichnet, dass die biosynthetischen Produkte nach und/oder während des Kultivierungs-
- 40

schrittes aus dem Kultivierungsmedium isoliert und gegebenenfalls aufgereinigt werden.

- 5 49. Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44 als ribosomale Bindungsstelle in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.
- 10 50. Verwendung der Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43 als -10-Region in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.
- 15 51. Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44.
52. Expressionseinheit gemäß Anspruch 51, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44. als ribosomale Bindungsstelle verwendet wird.
- 20 53. Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend mindestens eine der Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43.
- 25 54. Expressionseinheit gemäß Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass eine der Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43 als -10-Region verwendet wird.

SEQUENCE LISTING

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Psod-Expressionseinheiten

<130> PF 55185/Mec

<140> 20030320

<141>

<160> 44

<210> 1

<211> 173

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SUPEROXID\DISMUTASE\RXA03119\

<400> 1

gctgccaatt attccgggct tgtgacccgc tacccgataa ataggctcggc tgaaaaattt 60
cgttgcaata tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcca 120
agcgccatct gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tac 173

<210> 2

<211> 191

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SUPEROXID\DISMUTASE\RXA03119\

<400> 2

agctgccaat tattccgggc ttgtgacccg ctacccgata aataggctcgg ctgaaaaatt 60
tcgttgcaat atcaacaaaa aggcctatca ttgggaggtg tcgcaccaag tacttttgcg 120
aagcgccatc tgacggattt tcaaaagatg tatatgctcg gtgcggaaac ctacgaaagg 180
attttttacc c 191

<210> 3

<211> 1365

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> RXA00077

<400> 3

atgaatgatg agaattattca aagctccaac tatcagccat tcccgagttt tgacgattgg 60
aaacagatcg aggtgtcgcct cttagatgtc atcgaatcct cagccattt ttctgatttg 120
aaagatagca ctgatcggtt tgcgttagat gctgcgctag agagagcaaa aagagctgcc 180
gcagttgata ccaatgccat agaaggaatc ttccaaactg atcgcgggtt tacccataca 240
gttgcaacgc aggtagggggc ttgggagcaa caaatggcga tgaaaggcaa acatgttaag 300

cctgcgtttg acgatactct agaaggcttt gagtatgttc tcgatgcagt aactggtaga 360
 actccaatct ctcagcaatg gattagaaat ttgcacgccg tcattctgcg gagccaagaa 420
 agccacgagg tttttacagc cgttggagtc caaaatcagg cgcttcagaa aggcgagtat 480
 aaaactcagc caaatagtcc acagcgctca gatggatctg tacatgcata cgccccagtt 540
 gaagatactc ctgctgaaat ggctagattt atttcagaac ttgaatctaa ggaattctta 600
 gcagccgaga aggttattca agctgcctat gccactatg ctttcgtatg tattcatcct 660
 tttgcagatg ggaatggacg agttgcacga gccttggcta gtgtttttct atacaaagat 720
 cctggtgtcc ctctcgtaat ctaccaagat caacgcagag attacatcca tgctctagaa 780
 gcagcggaca agaataaccc gctcctgctg attagattct ttgctgaacg agtgaccgat 840
 actattaact ctattatcgt tgatctcact accccgatcg cgggtaaate tggttcggct 900
 aagctttcgg atgcgctacg cccactcgc gtattaccag aattacatga tgctgcacat 960
 aggctccaag aaagtttatt tacagaaatc cgatctcgat tggatgaaga aggaaaaagg 1020
 aatgggttgg agtttctact tcaacggatt tttatcggtt cccattcaa tctgccagag 1080
 ggctataacg ctttccctga tagctattgt ctgaccttag ctttcaatag caactctcca 1140
 aaacaaatct tccaccgct atccatagta atagcagctc gagatgggaa aagagcgagc 1200
 agcgacctcg tggcagctac ttctattgga tacaactttc acgcttacgg acgtgaagtc 1260
 gagcctgttg ttactgaaag ctttcgagaa cgtgtgaaaa tttacgccga cgggattgta 1320
 gatcacttct taaccgaact ggctaaaaag tttcaacaga attaa 1365

<210> 4

<211> 454

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 4

Met	Asn	Asp	Glu	Asn	Ile	Gln	Ser	Ser	Asn	Tyr	Gln	Pro	Phe	Pro	Ser
1				5					10					15	
Phe	Asp	Asp	Trp	Lys	Gln	Ile	Glu	Val	Ser	Leu	Leu	Asp	Val	Ile	Glu
			20					25					30		
Ser	Ser	Arg	His	Phe	Ser	Asp	Leu	Lys	Asp	Ser	Thr	Asp	Arg	Ser	Ala
		35					40					45			
Leu	Asp	Ala	Ala	Leu	Glu	Arg	Ala	Lys	Arg	Ala	Ala	Ala	Val	Asp	Thr
	50					55					60				
Asn	Ala	Ile	Glu	Gly	Ile	Phe	Gln	Thr	Asp	Arg	Gly	Phe	Thr	His	Thr
65					70				75					80	
Val	Ala	Thr	Gln	Val	Gly	Ala	Trp	Glu	Gln	Gln	Met	Ala	Met	Lys	Gly
			85						90					95	
Lys	His	Val	Lys	Pro	Ala	Phe	Asp	Asp	Thr	Leu	Glu	Gly	Phe	Glu	Tyr
			100					105					110		

Val Leu Asp Ala Val Thr Gly Arg Thr Pro Ile Ser Gln Gln Trp Ile
 115 120 125
 Arg Asn Leu His Ala Val Ile Leu Arg Ser Gln Glu Ser His Glu Val
 130 135 140
 Phe Thr Ala Val Gly Val Gln Asn Gln Ala Leu Gln Lys Gly Glu Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Gln Pro Asn Ser Pro Gln Arg Ser Asp Gly Ser Val His Ala
 165 170 175
 Tyr Ala Pro Val Glu Asp Thr Pro Ala Glu Met Ala Arg Phe Ile Ser
 180 185 190
 Glu Leu Glu Ser Lys Glu Phe Leu Ala Ala Glu Lys Val Ile Gln Ala
 195 200 205
 Ala Tyr Ala His Tyr Ala Phe Val Cys Ile His Pro Phe Ala Asp Gly
 210 215 220
 Asn Gly Arg Val Ala Arg Ala Leu Ala Ser Val Phe Leu Tyr Lys Asp
 225 230 235 240
 Pro Gly Val Pro Leu Val Ile Tyr Gln Asp Gln Arg Arg Asp Tyr Ile
 245 250 255
 His Ala Leu Glu Ala Ala Asp Lys Asn Asn Pro Leu Leu Leu Ile Arg
 260 265 270
 Phe Phe Ala Glu Arg Val Thr Asp Thr Ile Asn Ser Ile Ile Val Asp
 275 280 285
 Leu Thr Thr Pro Ile Ala Gly Lys Ser Gly Ser Ala Lys Leu Ser Asp
 290 295 300
 Ala Leu Arg Pro Thr Arg Val Leu Pro Glu Leu His Asp Ala Ala His
 305 310 315 320
 Arg Leu Gln Glu Ser Leu Phe Thr Glu Ile Arg Ser Arg Leu Asp Glu
 325 330 335
 Glu Gly Lys Arg Asn Gly Leu Glu Phe Leu Leu Gln Arg Ile Phe Ile
 340 345 350
 Gly Ser Pro Phe Asn Leu Pro Glu Gly Tyr Asn Ala Phe Pro Asp Ser
 355 360 365
 Tyr Cys Leu Thr Leu Ala Phe Asn Ser Asn Ser Pro Lys Gln Ile Phe
 370 375 380
 His Pro Leu Ser Ile Val Ile Ala Ala Arg Asp Gly Lys Arg Ala Ser
 385 390 395 400
 Ser Asp Leu Val Ala Ala Thr Ser Ile Gly Tyr Asn Phe His Ala Tyr
 405 410 415
 Gly Arg Glu Val Glu Pro Val Val Thr Glu Ser Phe Arg Glu Arg Val
 420 425 430
 Lys Ile Tyr Ala Asp Gly Ile Val Asp His Phe Leu Thr Glu Leu Ala
 435 440 445

Lys Lys Phe Gln Gln Asn
450

<210> 5
<211> 35
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID5

<400> 5
gagagagaga cgcgtcccag tggctgagac gcatc

35

<210> 6
<211> 34
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_6

<400> 6
ctctctctgt cgacgaattc aatcttacgg cctg

34

<210> 7
<211> 4323
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_7

<220>
<221> misc_feature
<222> (457)..(1248)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (1515)..(2375)
<223> Ori-EC (pMB)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1515)..(2375)
<223> Ori-EC (pMB) complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (2418)..(3839)
<223> SacB complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (3840)..(4302)
<223> PsacB complement

<400> 7
tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtacca cgcgtcatat gactagttcg gacctaggga 60

tatcgtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatcctct agaccggga 120
tttaaatacgc tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag tccgcagaaa 180
cgggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaaggga aaacgcaagc 240
gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga ctgggcggtt 300
ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag 360
ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca 420
agatctgac aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac 480
gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca 540
atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt 600
gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgagycagc gcggctatcg 660
tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga 720
agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct 780
cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg 840
gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcgagcacg tactcggatg 900
gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc 960
gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat 1020
ggcgaatgct gcttgccgaa tatcatgggtg gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac 1080
tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt 1140
gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg tatcgccgct 1200
cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agcgggactc 1260
tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca 1320
ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga 1380
tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcca cgctagcggc gcgccggccg 1440
gcccgggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc 1500
gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 1560
cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1620
tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 1680
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1740
aaccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 1800
cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg 1860
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg ttaggtcgt tcgctccaag 1920
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttate cggtaactat 1980

cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 2040
aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 2100
tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 2160
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt 2220
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2280
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcattg 2340
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaaagg ccggccgcgg ccgccatcgg 2400
cattttcttt tgcgttttta tttgttaact gttaattgtc cttgttcaag gatgctgtct 2460
ttgacaacag atgttttctt gcctttgatg ttcagcagga agctcggcgc aaacgttgat 2520
tgtttgtctg cgtagaatcc tctgtttgtc atatagcttg taatcacgac attgtttcct 2580
ttcgcttgag gtacagcgaa gtgtgagtaa gtaaaggta catcgtagg atcaagatcc 2640
atttttaaca caaggccagt tttgttcagc ggcttgtatg ggccagttaa agaattagaa 2700
acataaccaa gcatgtaaat atcgtagac gtaatgccgt caatcgatcatt ttttgatccg 2760
cgggagtcag tgaacaggta ccatttgccg ttcattttta agacgttcgc gcgttcaatt 2820
tcattctgta ctgtgttaga tgcaatcagc ggtttcatca cttttttcag tgtgtaatca 2880
tcgttttagct caatcatacc gagagcgccg tttgctaact cagccgtgcg ttttttatcg 2940
ctttgcagaa gtttttgact ttcttgacgg aagaatgatg tgcttttgcc atagtatgct 3000
ttgttaaata aagattcttc gccttggtag ccattcttcag ttccagtgtt tgcttcaaatt 3060
actaagtatt tgtggccttt atcttctacg tagtgaggat ctctcagcgt atggttgtcg 3120
cctgagctgt agttgccttc atcgatgaac tgctgtacat tttgatacgt ttttccgtca 3180
ccgtcaaaga ttgatttata atcctctaca ccgttgatgt tcaaagagct gtctgatgct 3240
gatacgtaa cttgtgcagt tgtcagtgtt tgtttgccgt aatgtttacc ggagaaatca 3300
gtgtagaata aacggatttt tccgtcagat gtaaagtgtg ctgaacctga ccattcttgt 3360
gtttggtctt ttaggataga atcatttgca tcgaatttgt cgctgtcttt aaagacgcgg 3420
ccagcgtttt tccagctgtc aatagaagtt tcgcccactt tttgatagaa catgtaaatc 3480
gatgtgtcat ccgcattttt aggatctccg gctaattgaa agacgatgtg gtagccgtga 3540
tagtttgca cagtgcgctc agcgttttgt aatggccagc tgtcccaaac gtccaggcct 3600
tttgcagaag agatattttt aattgtggac gaatcaaatt cagaaacttg atatttttca 3660
tttttttgct gttcagggat ttgcagcata tcatggcgtg taatatggga aatgccgtat 3720
gtttccttat atggcttttg gttcggtttct ttcgcaaacg cttgagttgc gcctcctgcc 3780
agcagtgcgg tagtaaagggt taatactgtt gcttgttttg caaacttttt gatgttcattc 3840
gttcatgtct ctttttttat gtactgtgtt agcgggtctgc ttcttcagc cctcctgttt 3900

gaagatggca agttagttac gcacaataaa aaaagaccta aaatatgtaa ggggtgacgc 3960
 caaagtatac actttgccct ttacacattt taggtcttgc ctgctttatc agtaacaaac 4020
 ccgcgcgatt tacttttcga cctcattcta ttagactctc gtttggattg caactgggtct 4080
 attttcctct tttgtttgat agaaaatcat aaaaggattt gcagactacg ggcctaaaga 4140
 actaaaaaat ctatctgttt cttttcattc tctgtatttt ttatagtttc tgttgcatgg 4200
 gcataaagtt gccttttttaa tcacaattca gaaaatatca taatatctca tttcactaaa 4260
 taatagtga cggcaggtat atgtgatggg ttaaaaagga tcggcggccg ctcgatttaa 4320
 atc 4323

<210> 8
 <211> 5860
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <223> PCIS\LYSC

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (155)..(1420)
 <223> lysC

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1974)..(2765)
 <223> KanR

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3032)..(3892)
 <223> Ori-EC complement

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3913)..(3934)
 <223> sacB downstream complement

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3935)..(5356)
 <223> sacB (Bacillus Subtilis) complement

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5357)..(5819)
 <223> Promotor sacB complement

<400> 8
 cccggtacca cgcgtcccag tggctgagac gcatccgcta aagccccagg aaccctgtgc 60
 agaaagaaaa cactcctctg gctaggtaga cacagtttat aaaggtagag ttgagcgggt 120
 aactgtcagc acgtagatcg aaaggtgcac aaaggtggcc ctggtcgtac agaaatatgg 180
 cggttcctcg cttgagagtg cggaacgcat tagaaacgtc gctgaacgga tcgttgccac 240

caagaaggct ggaaatgatg tcgtggttgt ctgctccgca atgggagaca ccacggatga 300
acttctagaa cttgcagcgg cagtgaatcc cgttccgcca gctcgtgaaa tggatatgct 360
cctgactgct ggtgagcgta tttctaacgc tctcgtcgcc atggctattg agtcccttgg 420
cgcagaagcc caatctttca cgggctctca ggctgggtgtg ctcaccaccg agcgccacgg 480
aaacgcacgc attgttgatg tcactccagg tcgtgtgcgt gaagcactcg atgagggcaa 540
gatctgcatt gttgctgggt tccaggggtg taataaagaa acccgcgatg tcaccacggt 600
gggtcgtggt ggttctgaca ccactgcagt tgcgttggca gctgctttga acgctgatgt 660
gtgtgagatt tactcggacg ttgacgggtg gtataccgct gacccgcgca tcgttcctaa 720
tgcacagaag ctggaaaagc tcagcttcga agaaatgctg gaacttgctg ctggttgctc 780
caagattttg gtgctgcgca gtgttgaata cgctcgtgca ttcaatgtgc cacttcgcgt 840
acgctcgtct tatagtaatg atcccggcac tttgattgcc ggctctatgg aggatattcc 900
tgtggaagaa gcagtcctta ccggtgtcgc aaccgacaag tccgaagcca aagtaaccgt 960
tctgggtatt tccgataagc caggcgaggc tgcgaagggt ttccgtgcgt tggctgatgc 1020
agaaatcaac attgacatgg ttctgcagaa cgtctcttct gtagaagacg gcaccaccga 1080
catcaccttc acctgccctc gttccgacgg ccgccgcgcg atggagatct tgaagaagct 1140
tcaggttcag ggcaactgga ccaatgtgct ttacgacgac caggtcggca aagtctccct 1200
cgtgggtgct ggcataaagt ctcaccacgg tgttaccgca gagttcatgg aagctctgcg 1260
cgatgtcaac gtgaacatcg aattgatttc cacctctgag attcgtattt ccgtgctgat 1320
ccgtgaagat gatctggatg ctgctgcacg tgcattgcat gagcagttcc agctgggcgg 1380
cgaagacgaa gccgtcgttt atgcaggcac cggacgctaa agtttttaaag gagtagtttt 1440
acaatgacca ccatcgcagt tggtgggtgca accggccagg tcggccagggt tatgcgcacc 1500
cttttggaag agcgcaattt cccagctgac actgttcgtt tctttgcttc cccacgttcc 1560
gcaggccgta agattgaatt cgctcgacatc gatgctcttc tgcgttaatt aacaattggg 1620
atcctctaga cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga 1680
aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga 1740
caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat 1800
agctagactg ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct ggggcgcctt 1860
ctggttaagg tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg ccaaggatct 1920
gatggcgagc gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcgttt cgcattgattg 1980
aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg 2040
actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg 2100
ggcgcgccgt tctttttgtc aagaccgacc tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg 2160

aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg 2220
ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc 2280
tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc 2340
tgcatacgct tgatccggct acctgcccac tcgaccacca agcgaaacat cgcatacgagc 2400
gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc 2460
aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg 2520
atctcgtcgt gacccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct 2580
tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 2640
tggctaccgc tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc 2700
tttacggtat cgcgctccc gattcgcagc gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt 2760
tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgacgcca acctgccatc 2820
acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaaggttg ggcttcggaa tcgttttccg 2880
ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcgg ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc 2940
tagcggcgcg ccggccggcc cgggtgtgaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 3000
gcatcaggcg ctcttccgct tcctcgtcga ctgactcgtc gcgctcggtc gttcggctgc 3060
ggcgagcggc atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata 3120
acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 3180
cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct 3240
caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa 3300
gctccctcgt gcgctctcct gttecgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc 3360
tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt 3420
aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaacccc cgttcagccc gaccgctgcg 3480
ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttag acacgactta tcgccactgg 3540
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatatg aggcgggtgct acagagttct 3600
tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc 3660
tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 3720
ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 3780
aagaagatcc tttgatcttt tctacggggc ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt 3840
aagggatattt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg 3900
gccgcggccg ccatcggcac tttcttttgc gtttttattt gttaactggt aattgtcctt 3960
gttcaaggat gctgtctttg acaacagatg ttttcttgcc tttgatgttc agcaggaagc 4020
tcggcgcaaa cgttgattgt ttgtctgcgt agaatectct gtttgtcata tagcttgtaa 4080

tcacgacatt gtttcctttc gcttgaggta cagcgaagtg tgagtaagta aaggttacat 4140
cgttaggatc aagatccatt tttaacacaa ggccagtttt gttcagcggc ttgtatgggc 4200
cagttaaaga attagaaaca taaccaagca tgtaaataac gttagacgta atgccgtcaa 4260
tcgtcatttt tgatccgcgg gagtcagtga acaggtacca tttgccgttc attttaaaga 4320
cgttcgcgcg ttcaatttca tctgttactg tgtttagatgc aatcagcggg ttcattcactt 4380
ttttcagtgt gtaatcatcg tttagctcaa tcataccgag agcgccgttt gctaactcag 4440
ccgtgcgttt tttatcgctt tgcagaagtt tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc 4500
ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc 4560
cagtgtttgc ttcaaatact aagtatttgt ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc 4620
tcagcgtatg gttgtcgcct gagctgtagt tgccttcacg gatgaactgc tgtacatttt 4680
gatacgtttt tccgtcaccg tcaaagattg atttataatc ctctacaccg ttgatgttca 4740
aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat 4800
gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg 4860
aacctgacca ttcttgtgtt tgggtctttta ggatagaatc atttgcacg aatttgtcgc 4920
tgtctttaaa gacgcggcca gcgtttttcc agctgtcaat agaagtttcg ccgacttttt 4980
gatagaacat gtaaatacgt gtgtcatccg catttttagg atctccggct aatgcaaaga 5040
cgatgtggtg gccgtgatag tttgcgacag tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt 5100
cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga tatttttaat tgtggacgaa tcaaattcag 5160
aaacttgata tttttcattt ttttgctgtt cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa 5220
tatgggaaat gccgtatgtt tccttatatg gcttttggtt cgtttctttc gcaaacgctt 5280
gagttgcgcc tcctgccagc agtgccgtag taaagggtta tactgttgct tgttttgcaa 5340
actttttgat gttcatcggt catgtctcct tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc 5400
ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa 5460
tatgtaaggg gtgacgccaa agtatacact ttgcccttta cacatttttag gtcttgccctg 5520
ctttatcagt aacaaacccg cgcgatttac ttttcgacct cattctatta gactctcggt 5580
tggtattgcaa ctggtctatt ttctctttt gtttgataga aaatcataaa aggatttgca 5640
gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta tctgtttctt ttcattctct gtatttttta 5700
tagtttctgt tgcattggga taaagttgcc tttttaatca caattcagaa aatatcataa 5760
tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg 5820
gcggccgctc gatttaaatc tcgagaggcc tgacgtcggg 5860

<210> 9

<211> 38

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SEQ_ID_9

<400> 9

cggcaccacc gacatcatct tcacctgccc tcgttccg

38

<210> 10

<211> 38

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SEQ_ID_10

<400> 10

cggaacgagg gcaggtgaag atgatgtcgg tgggtgccg

38

<210> 11

<211> 1263

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> LYSC-GEN

<400> 11

gtggccctgg tcgtacagaa atatggcggg tctctgcttg agagtgcgga acgcattaga 60

aacgtcgctg aacggatcgt tgccaccaag aaggctggaa atgatgtcgt ggttgtctgc 120

tccgcaatgg gagacaccac ggatgaactt ctagaacttg cagcggcagt gaatcccgtt 180

ccgccagctc gtgaaatgga tatgctcctg actgctgggtg agcgtatttc taacgctctc 240

gtcgccatgg ctattgagtc ccttggcgca gaagcccaat ctttcacggg ctctcaggct 300

ggtgtgctca ccaccgagcg ccacggaaac gcacgcattg ttgatgtcac tccaggctcg 360

gtgcgtgaag cactcgatga gggcaagatc tgcattgttg ctggtttcca ggggtgtaat 420

aaagaaaccc gcgatgtcac cacgttgggt cgtggtgggt ctgacaccac tgcagttgcg 480

ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatttact cggacgttga cgggtgtgtat 540

accgctgacc cgcgcatcgt tcctaattgca cagaagctgg aaaagctcag cttcgaagaa 600

atgctggaac ttgctgctgt tggctccaag attttgggtgc tgcgcagtgt tgaatacgct 660

cgtgcattca atgtgccact tcgcgtacgc tcgtcttata gtaatgatcc cggcactttg 720

attgccgget ctatggagga tattcctgtg gaagaagcag tccttaccgg tgtcgcaacc 780

gacaagtccg aagccaaagt aaccgttctg ggtatttccg ataagccagg cgaggctgcg 840

aagggttttc gtgcgttggc tgatgcagaa atcaacattg acatgggttct gcagaacgctc 900

tcttctgtag aagacggcac caccgacatc accttcacct gccctcggtc cgacggccgc 960

cgcgcgatgg agatcttgaa gaagcttcag gttcagggca actggaccaa tgtgctttac 1020

12

gacgaccagg tcggcaaagt ctccctcgtg ggtgctggca tgaagtctca cccaggtgtt 1080
 accgcagagt tcatggaagc tctgcgcgat gtcaacgtga acatcgaatt gatttccacc 1140
 tctgagattc gtatttccgt gctgatccgt gaagatgac tggatgctgc tgcacgtgca 1200
 ttgcatgagc agttccagct gggcggcgaa gacgaagccg tcgtttatgc aggcaccgga 1260
 cgc 1263

<210> 12
 <211> 5860
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <223> PCIS\LYSC\THR311ILE

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (155)..(1420)
 <223> LysC

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1974)..(2765)
 <223> KanR

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3032)..(3892)
 <223> Ori-EC (pMB)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3913)..(3934)
 <223> C_region : sacB downstream (complement)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3935)..(5356)
 <223> sacB Bacillus Subtilis (complement)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5357)..(5819)
 <223> Promotor sacB (complement)

<400> 12
 cccggtacca cgcgtcccag tggctgagac gcatccgcta aagccccagg aaccctgtgc 60
 agaaagaaaa cactcctctg gctaggtaga cacagtttat aaaggtagag ttgagcgggt 120
 aactgtcagc acgtagatcg aaaggtgcac aaaggtggcc ctggtcgtac agaaatatgg 180
 cggttcctcg cttgagagtg cggaacgcat tagaaacgtc gctgaacgga tcgttgccac 240
 caagaaggct ggaaatgatg tcgtggttgt ctgctccgca atgggagaca ccacggatga 300
 acttctagaa cttgcagcgg cagtgaatcc cgttccgcca gctcgtgaaa tggatatgct 360
 cctgactgct ggtgagcgtg tttctaacgc tctcgtcgcc atggctattg agtccttgg 420

cgcagaagcc caatctttca cgggctctca ggctgggtgtg ctcaccaccg agcgccacgg 480
aaacgcacgc attgttgatg tcaactccagg tcgtgtgcgt gaagcactcg atgagggcaa 540
gatctgcatt gttgctgggt tccagggtgt taataaagaa acccgcgatg tcaccacgtt 600
gggtcgtggg ggttctgaca ccaactgcagt tgcgttggca gctgctttga acgctgatgt 660
gtgtgagatt tactcggacg ttgacgggtg gtataccgct gacccgcgca tcgttcctaa 720
tgcacagaag ctggaaaagc tcagcttcga agaaatgctg gaacttgctg ctggttggtc 780
caagattttg gtgctgcgca gtgttgaata cgctcgtgca ttcaatgtgc cacttcgcgt 840
acgctcgtct tatagtaatg atcccggcac tttgattgcc ggctctatgg aggatattcc 900
tgtggaagaa gcagtcctta ccgggtgtcg aaccgacaag tccgaagcca aagtaaccgt 960
tctgggtatt tccgataagc caggcgaggc tgcgaagggt ttccgtgcgt tggctgatgc 1020
agaaatcaac attgacatgg ttctgcagaa cgtctcttct gtagaagacg gcaccaccga 1080
catcatcttc acctgccctc gttccgacgg ccgccgcgcg atggagatct tgaagaagct 1140
tcaggttcag ggcaactgga ccaatgtgct ttacgacgac caggtcggca aagtctccct 1200
cgtgggtgct ggcatgaagt ctcaccacgg tgttaccgca gagttcatgg aagctctgcg 1260
cgatgtcaac gtgaacatcg aattgatttc cacctctgag attcgtattt ccgtgctgat 1320
ccgtgaagat gatctggatg ctgctgcacg tgcattgcat gagcagttcc agctgggcgg 1380
cgaagacgaa gccgtcgttt atgcaggcac cggacgctaa agttttaaaag gagtagtttt 1440
acaatgacca ccatcgcagt tgttggtgca accggccagg tcggccagggt tatgcgacc 1500
cttttggaag agcgcaattt cccagctgac actgttcgtt tctttgcttc cccacgttcc 1560
gcaggccgta agattgaatt cgtcgacatc gatgctcttc tgcgttaatt aacaattggg 1620
atcctctaga cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga 1680
aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga 1740
caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat 1800
agctagactg ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct ggggcgcct 1860
ctggtaaggt tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg ccaaggatct 1920
gatggcgag gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcgttt cgcattgattg 1980
aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttgggctatg 2040
actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg 2100
ggcgcccgggt tctttttgtc aagaccgacc tgtccgggtg cctgaatgaa ctgcaggacg 2160
aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg 2220
ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc 2280
tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc 2340

tgcatacgct tgatccggct acctgcccac tcgaccacca agcgaaacat cgcacgagc 2400
gagcacgtac tcggatggaa gccgggtcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc 2460
aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg 2520
atctcgtcgt gacccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct 2580
tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 2640
tggctacccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc 2700
tttacggtat cgccgctccc gattcgcagc gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt 2760
tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgacgcccac acctgccatc 2820
acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaagggtg ggcttcggaa tcgttttccg 2880
ggacgccggc tggatgatec tccagcgcgg ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc 2940
tagcggcgcg ccggccggcc cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 3000
gcatcaggcg ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc 3060
ggcgagcggc atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata 3120
acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 3180
cgttgctggc gtttttccat aggtccgccc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct 3240
caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccttgaa 3300
gtccctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc 3360
tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg 3420
aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg 3480
ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg 3540
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct 3600
tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc 3660
tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 3720
ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 3780
aagaagatcc tttgatcttt tctacggggg ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt 3840
aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg 3900
gccgcggccg ccatcggcat tttcttttgc gtttttattt gtttaactgtt aattgtcctt 3960
gttcaaggat gctgtctttg acaacagatg ttttcttgcc tttgatgttc agcaggaagc 4020
tcggcgcaaa cgttgattgt ttgtctgcgt agaatcctct gtttgtcata tagcttgtaa 4080
tcacgacatt gtttcctttc gcttgaggta cagcgaagtg tgagtaagta aaggttacat 4140
cgtaggatac aagatccatt tttaacacaa ggccagtttt gttcagcggc ttgtatgggc 4200
cagttaaaga attagaaaca taaccaagca tgtaaatac gttagacgta atgccgtcaa 4260

tcgtcatttt tgatccgcgg gagtcagtga acaggtacca tttgccgttc attttaaaga 4320
cgttcgcgcg ttcaatttca tctgttactg tgtagatgc aatcagcggg ttcactactt 4380
ttttcagtgt gtaatcatcg tttagctcaa tcataccgag agcgccgttt gctaactcag 4440
ccgtgcgttt tttatcgctt tgcagaagtt tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc 4500
ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc 4560
cagtgtttgc ttcaaatact aagtatttgt ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc 4620
tcagcgtatg gttgtcgcct gagctgtagt tgccttcacg gatgaactgc tgtacatttt 4680
gatacgtttt tccgtcaccg tcaaagattg atttataatc ctctacaccg ttgatgttca 4740
aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat 4800
gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg 4860
aacctgacca ttcttgtgtt tgggtctttta ggatagaatc atttgcacg aatttgtcgc 4920
tgtctttaaa gacgcggcca gcgtttttcc agctgtcaat agaagtttcg ccgacttttt 4980
gatagaacat gtaaatacgt gtgtcatccg catttttagg atctccggct aatgcaaaga 5040
cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt 5100
cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga tatttttaat tgtggacgaa tcaaattcag 5160
aaacttgata tttttcattt ttttgctgtt cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa 5220
tatgggaaat gccgtatgtt tccttatatg gcttttggtt cgtttctttc gcaaacgctt 5280
gagttgcgcc tcctgccagc agtgcggtag taaagggtta tactgttgct tgttttgcaa 5340
actttttgat gttcatcggt catgtctcct tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc 5400
ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa 5460
tatgtaaggg gtgacgcaa agtatacact ttgcccttta cacatttttag gtcttgccctg 5520
ctttatcagt aacaaaccog cgcgatttac ttttcgacct cattctatta gactctcggt 5580
tggtattgaa ctggtctatt ttctctttt gtttgataga aaatcataaa aggatttgca 5640
gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta tctgtttctt ttcattctct gtatttttta 5700
tagtttctgt tgcatgggca taaagttgcc tttttaatca caattcagaa aatatcataa 5760
tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg 5820
gcggccgctc gatttaaatc tcgagaggcc tgacgtcggg 5860

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>

<223> SOD8

<400> 13

accctggcgg aaaccctgag tcg

23

<210> 14

<211> 65

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SOD1

<400> 14

tacgaccagg gccacgggta aaaaatcctt tcgtaggttt ccgcaccgag catatacatc 60

ttttg

65

<210> 15

<211> 40

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> LYSC2

<400> 15

cctacgaaag gatttttttac ccgtggccct ggtcgtacag

40

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> LYSC6

<400> 16

gattagtgga acctcgtcgt c

21

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SOD4

<400> 17

gcggcgcagg attttctaa

19

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> LYSC4

<400> 18

tcggttgcct gagtaatgtc tt

22

<210> 19
<211> 5720
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> PK19

<220>
<221> misc_feature
<222> (2706)..(3968)
<223> lysC complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (3969)..(4166)
<223> Psod complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (4538)..(5236)
<223> 5' lysC complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (5626)..(6420)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (6449)..(6911)
<223> PsacB

<220>
<221> misc_feature
<222> (6912)..(6)
<223> sacB

<400> 19
ggtcgactct agaggatccc cgggtaccga gctcgaattc actggccgtc gttttacaac 60
gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttacc aacttaatcg ccttgcagca catccccctt 120
tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca 180
gcctgaatgg cgaatggcga taagctagct tcacgctgcc gcaagcactc agggcgcaag 240
ggctgctaaa ggaagcggaa cacgtagaaa gccagtccgc agaaacgggtg ctgacccccg 300
atgaatgtca gctactgggc tatctggaca agggaaaacg caagcgcaaa gagaaagcag 360
gtagcttgca gtgggcttac atggcgatag ctagactggg cggttttatg gacagcaagc 420
gaaccggaat tgccagctgg ggcgccctct ggtaagggtg ggaagccctg caaagtaaac 480
tggtatggctt tcttgccgcc aaggatctga tggcgcaggg gatcaagatc tgatcaagag 540
acaggatgag gatcgtttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc 600
gcttgggtgg agaggctatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg ctgctctgat 660
gccgccgtgt tccggctgtc agcgcagggg cgcccgggtc tttttgtcaa gaccgacctg 720

tccggtgcc tgaatgaact ccaagacgag gcagcgcggc tatcgtggct ggccacgacg 780
ggcgttcctt ggcgagctgt gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga ctggctgcta 840
ttgggcgaag tgccggggca ggatctcctg tcatctcacc ttgctcctgc cgagaaagta 900
tccatcatgg ctgatgcaat gcggcggtg catacgcttg atccggctac ctgcccattc 960
gaccaccaag cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc cggctcttgtc 1020
gatcaggatg atctggacga agagcatcag gggctcgcg cagccgaact gttcgccagg 1080
ctcaaggcgc ggatgcccga cggcgaggat ctcgtcgtga cccatggcga tgcctgcttg 1140
ccgaatatca tgggtgaaaa tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg ccggctgggt 1200
gtggcggacc gctatcagga catagcgttg gctaccctg atattgctga agagcttggc 1260
ggcgaatggg ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg ccgctcccga ttcgcagcgc 1320
atcgcccttct atcgcccttct tgacgagttc ttctgagcgg gactctgggg ttcgctagag 1380
gatcgatcct ttttaacca tcacatatac ctgccgttca ctattattta gtgaaatgag 1440
atattatgat attttctgaa ttgtgattaa aaaggcaact ttatgcccat gcaacagaaa 1500
ctataaaaaa tacagagaat gaaaagaaac agatagattt tttagttctt taggcccgtg 1560
gtctgcaa at ccttttatga ttttctatca acaaaaagag gaaaatagac cagttgcaat 1620
ccaaacgaga gtctaataga atgaggtcga aaagtaa atc gcgcggggtt gttactgata 1680
aagcaggcaa gacctaaa at gtgtaaaggg caaagtgtat actttggcgt cacccttac 1740
atatttttagg tcttttttta ttgtgcgtaa ctaacttgcc atcttcaaac aggagggtg 1800
gaagaagcag accgctaaca cagtacataa aaaaggagac atgaacgatg aacatcaaaa 1860
agtttgcaaa acaagcaaca gtattaacct ttactaccgc actgctggca ggaggcgcaa 1920
ctcaagcgtt tgcgaaagaa acgaaccaa agccatataa ggaaacatac ggcatttccc 1980
atattacag ccatgatatg ctgcaaatcc ctgaacagca aaaaaatgaa aaatatcaag 2040
tttctgaatt tgattcgtcc acaattaaaa atatctcttc tgcaaaaggc ctggacgttt 2100
gggacagctg gccattacaa aacgctgacg gcactgtcgc aaactatcac ggctaccaca 2160
tcgtctttgc attagccgga gatcctaaaa atgcggatga cacatcgatt tacatgttct 2220
atcaaaaagt cggcgaaact tctattgaca gctggaaaaa cgctggccgc gtctttaag 2280
acagcgacaa attcgatgca aatgattcta tcctaaaaga ccaaacacaa gaatggtcag 2340
gttcagccac atttacatct gacggaaaaa tccgtttatt ctacactgat ttctccggtg 2400
aacattacgg caaacaacaa ctgacaactg cacaagttaa cgtatcagca tcagacagct 2460
ctttgaacat caacggtgta gaggattata aatcaatctt tgacggtgac ggaaaaacgt 2520
atcaaaatgt acagcagttc atcgatgaag gcaactacag ctcaggcgac aaccatacgc 2580
tgagagatcc tcactacgta gaagataaag gccacaaata cttagtattt gaagcaaaca 2640

ctggaactga agatggctac caaggcgaag aatctttatt taacaaagca tactatggca 2700
aaagcacatc attcttccgt caagaaagtc aaaaacttct gcaaagcgat aaaaaacgca 2760
cggctgagtt agcaaacggc gctctcggta tgattgagct aaacgatgat tacacactga 2820
aaaaagtgat gaaaccgctg attgcatcta acacagtaac agatgaaatt gaacgcgcga 2880
acgtctttaa aatgaacggc aaatgggtacc tgttcactga ctcccgcgga tcaaaaatga 2940
cgattgacgg cattacgtct aacgatattt acatgcttgg ttatgtttct aattctttaa 3000
ctggcccata caagccgctg aacaaaactg gccttgtgtt aaaaatggat cttgatccta 3060
acgatgtaac ctttacttac tcacacttcg ctgtacctca agcgaaagga aacaatgtcg 3120
tgattacaag ctatatgaca aacagaggat tctacgcaga caaacaatca acgtttgcgc 3180
cgagcttcct gctgaacatc aaaggcaaga aaacatctgt tgtcaaagac agcatccttg 3240
aacaaggaca attaacagtt aacaaataaa aacgcaaaag aaaatgccga tgggtaccga 3300
gcgaaatgac cgaccaagcg acgcccacc tgccatcacg agatttcgat tccaccgccg 3360
ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg ttttcggga cgccctcgcg gacgtgctca 3420
tagtccacga cgcccgatg tttgtagccc tggccgacgg ccagcaggta ggccgacagg 3480
ctcatgccgg ccgccgccgc cttttcctca atcgctcttc gttcgtctgg aaggcagtac 3540
accttgatag gtgggctgcc cttcctgggt ggcttggttt catcagccat ccgcttgccc 3600
tcatctgtta cgccggcggt agccggccag cctcgcagag caggattccc gttgagcacc 3660
gccaggtgcg aataaggagc agtgaagaag gaacacccgc tcgcgggtgg gcctacttca 3720
cctatcctgc ccggctgacg ccgttgata caccaaggaa agtctacacg aaccctttgg 3780
caaaatcctg tatatcgtgc gaaaaaggat ggatataccg aaaaaatcgc tataatgacc 3840
ccgaagcagg gttatgcagc ggaaaagcgc tgcttccttg ctgttttggt gaatatctac 3900
cgactggaaa caggcaaatg caggaaatta ctgaactgag gggacaggcg agagacgatg 3960
ccaaagagct cctgaaaatc tcgataactc aaaaaatacg cccggtagtg atcttatttc 4020
attatggtga aagttggaac ctcttacgtg ccgatcaacg tctcattttc gccaaaagtt 4080
ggcccagggc ttcccggat caacaggagc accaggattt atttattctg cgaagtgatc 4140
ttccgtcaca ggtatattt cggcgcaaag tgcgtcgggt gatgctgcca acttactgat 4200
ttagtgatg atggtgtttt tgaggtgctc cagtggcttc tgtttctatc agctcctgaa 4260
aatctcgata actcaaaaaa tacgcccggt agtgatctta tttcattatg gtgaaagttg 4320
gaacctctta cgtgccgatc aacgtctcat tttcgccaaa agttggccca gggcttcccg 4380
gtatcaacag ggacaccagg atttatttat tctgcgaagt gatcttccgt cacaggattt 4440
tattcggcgc aaagtgcgtc gggatgatgct gccaaacttac tgatttagtg tatgatggtg 4500
tttttgaggt gctccagtg cttctgtttc tatcagggct ggatgatcct ccagcgcggg 4560

gatctcatgc tggagttctt cgcccacccc aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat 4620
aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta 4680
gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa 4740
acaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt 4800
tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgttct tctagtgtag 4860
ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta 4920
atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca 4980
agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag 5040
cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa 5100
agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga 5160
acaggagagc gcacgagggg gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc 5220
gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc 5280
ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt 5340
gctcacatgt tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt 5400
gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag 5460
gaagcggaag agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa 5520
tgcagctggc acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat 5580
gtgagttagc tcaactatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg 5640
ttgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac 5700
gccaagcttg catgcctgca 5720

<210> 20
<211> 27
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> LYSC23

<400> 20
caccgcggct ttggacatca ctgctac

27

<210> 21
<211> 26
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> LYSC24

<400> 21
cctggggctt tagcggatgc gtctca

26

<210> 22
<211> 8324
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> PK19

<220>
<221> misc_feature
<222> (2706)..(3968)
<223> lysC complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (3969)..(4166)
<223> Psod complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (4538)..(5236)
<223> 5' lysC complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (5626)..(6420)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (6449)..(6911)
<223> PsacB

<220>
<221> misc_feature
<222> (6912)..(6)
<223> sacB

<400> 22
aaacgcaaaa gaaaatgccg atgggtaccg agcgaaatga ccgaccaagc gacgccaac 60
ctgccatcac gagatttcga ttccaccgcc gccttctatg aaagggtggg cttcggaatc 120
gttttccggg acgccctcgc ggacgtgctc atagtccacg acgcccgtga ttttgtagcc 180
ctggccgacg gccagcaggt aggccgacag gctcatgccg gccgccgccg ccttttcctc 240
aatcgetctt cgttcgtctg gaaggcagta caccttgata ggtgggctgc ctttcctggt 300
tggcttggtt tcatcagcca tccgcttgcc ctcatctggt acgccggcgg tagccggcca 360
gcctcgcaga gcaggattcc cgttgagcac cgccaggtgc gaataaggga cagtgaagaa 420
ggaacacccg ctgcgcgggtg ggcctacttc acctatcctg cccggctgac gccgttgat 480
acaccaagga aagtctacac gaaccctttg gcaaaatcct gtatatcgtg cgaaaaagga 540
tggaataacc gaaaaaatcg ctataatgac cccgaagcag gggtatgcag cgaaaagcg 600
ctgcttcctt gctgttttgt ggaatatcta ccgactggaa acaggcaaatt gcaggaaatt 660
actgaactga ggggacaggc gagagacgat gccaaagagc tcctgaaaat ctcgataact 720

caaaaaatac gcccggtagt gatcttattt cattatggtg aaagttggaa cctcttacgt 780
gccgatcaac gtctcatttt cgccaaaagt tggcccaggg cttcccggta tcaacaggga 840
caccaggatt tatttattct gcgaagtgat cttccgtcac aggtatttat tcggcgcaaa 900
gtgcgtcggg tgatgctgcc aacttactga tttagtgtat gatggtgttt ttgaggtgct 960
ccagtggctt ctgtttctat cagctcctga aaatctcgat aactcaaaaa atacgcccgg 1020
tagtgatctt atttcattat ggtgaaagtt ggaacctctt acgtgccgat caacgtctca 1080
ttttcgccaa aagttggccc agggcttccc ggtatcaaca gggacaccag gatttattta 1140
ttctgcgaag tgatcttccg tcacaggtat ttattcggcg caaagtgcgt cgggtgatgc 1200
tgccaactta ctgatttagt gtatgatggt gtttttgagg tgctccagtg gcttctgttt 1260
ctatcagggc tggatgatcc tccagcgcg ggtatctcatg ctggagttct tcgcccaccc 1320
caaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga 1380
gttttcgttc cactgagcgt cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc 1440
tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt 1500
ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct tttccgaag gtaactggct tcagcagagc 1560
gcagatacca aatactgttc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc 1620
tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg 1680
cgataagtcg tgtcttaccg ggttggaactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg 1740
gtcgggctga acgggggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga 1800
actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc 1860
ggacaggtat ccggtaaagc gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg 1920
gggaaacgcc tggatatctt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg 1980
atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt 2040
tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc 2100
tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg 2160
aacgaccgag cgcagcgagt cagttagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc 2220
gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccgaactg 2280
gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa tgtgagttag ctcaactcatt aggcacccca 2340
ggctttacac tttatgcttc cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt 2400
tcacacagga aacagctatg accatgatta cgccaagctt gcatgcctgc aggtcgactc 2460
tagaggatcc ccgggtaccg agctcgaatt cgccctttcg gttgcctgag taatgtcttc 2520
tacctcgatt tccgtgccac ggaattcaat cttacggcct gcggaacgtg gggaagcaaa 2580
gaaacgaaca gtgtcagctg ggaaattgcg ctcttccaaa aggggtgcga taacctggcc 2640

gacctggccg gttgcaccaa caactgcgat ggtgggtcatt gtaaaactac tcctttaaaa 2700
ctttagcgtc cgggtgcctgc ataaacgacg gcttcgtctt cgccgcccag ctggaactgc 2760
tcatgcaatg cacgtgcagc agcatccaga tcatcttcac ggatcagcac ggaaatacga 2820
atctcagagg tggaaatcaa ttcgatgttc acgttgacat cgcgagagc ttccatgaac 2880
tctgcggtaa cacctgggtg agacttcatt ccagcaccca cgagggagac tttgccgacc 2940
tggtcgtcgt aaagcacatt ggtccagttg ccctgaacct gaagcttctt caagatctcc 3000
atcgcgcggc ggccgtcgga acgagggcag gtgaagatga tgctcgttgt gccgtcttct 3060
acagaagaga cgttctgcag aaccatgtca atgttgattt ctgcatcagc caacgcacgg 3120
aaaaccttcg cagcctcgcc tggcttatcg gaaataccca gaacggttac tttggcttcg 3180
gacttgtcgg ttgcgacacc ggtaaggact gcttcttcca caggaatata ctccatagag 3240
ccggcaatca aagtgccggg atcattacta taagacgagc gtacgcgaag tggcacattg 3300
aatgcacgag cgtattcaac actgcgcagc accaaaatct tggagccaac agcagcaagt 3360
tccagcattt cttcgaagct gagcttttcc agcttctgtg cattaggaac gatgcgcggg 3420
tcagcggtat acacaccgtc aacgtccgag taaatctcac acacatcagc gttcaaagca 3480
gctgccaacg caactgcagt ggtgtcagaa ccaccacgac ccaacgttgt gacatcgcg 3540
gtttctttat taacaccctg gaaaccagca acaatgcaga tcttgccctc atcgagtgt 3600
tcacgcacac gacctggagt gacatcaaca atgcgtgcgt ttccgtggcg ctcggttgtg 3660
agcacaccag cctgagagcc cgtgaaagat tgggcttctg cgccaaggga ctcaatagcc 3720
atggcgacga gagcgttaga aatacgctca ccagcagtc ggagcatata catttcacga 3780
gctggcgga cgggattcac tgccgctgca agttctagaa gttcatccgt ggtgtctccc 3840
attgcggagc agacaaccac gacatcattt ccagccttct tgggtggcaac gatccgttca 3900
gcgacgtttc taatgcgttc cgcactctca agcgaggaa cgccatattt ctgtacgacc 3960
agggccacgg gtaaaaaatc ctttcgtagg tttccgcacc gagcatatac atcttttgaa 4020
aatccgtcag atggcgcttc gcaaaagtac ttggtgcgac acctcccaat gataggcctt 4080
tttgttgata ttgcaacgaa atttttcagc cgacctattt atcgggtagc gggtcacaag 4140
cccgaataa ttggcagcta agtaggggtg aagggcataa ggcttctca attttcgaaa 4200
ggaacattcc tgttatggca tggtttttcg caccogaacc cgtgatggtt accgctgatg 4260
aggcgcttaa aggtggcagg catcctgttt tagaaaatcc tgcgccgcaa gggcgaattc 4320
actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaacctt ggcgttacct aacttaatcg 4380
ccttgacgca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg 4440
cccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggcga taagctagat gcatgctcga 4500
gcggccgcca gtgtgatgga tatctgcaga attcgccctt ggggcttttag cggatgcgtc 4560

tcagccactg ggacgcgttc caataaacag accatatatt gatattcgat ttaatatttg 4620
agacaaaagt gacaggtgct acttcgcgag caactcttta gtcaactacc ctgaatcaag 4680
tgcaaagcaa tctgctcgcc gtgcttttcg ccctagcatc ggcattaaca atcgcatggg 4740
gcaccgtggg cagacaccgg atcgcgctcc gcaccccaaa agatggctcc ctaaggagct 4800
cacctttact caatgctctg atgacaccga tgtggtgggc aggcatgagt accgcgatgc 4860
tggcatatth cttacaaaca gtagcacttg gtttcggcac cctcttggtg gtgcaaccag 4920
tgcttgctct gtcgctgatg ttcacgctgc cgctctcagc acgattcaat ggctaccgac 4980
tacgccgaac tgaaatcttc tgggctaccc tcctcaccgt agccgtgggc atcatgatcg 5040
ttttgggacg ccccttccc ggaaaccccc acccccactc gatcgatgga ttccagtact 5100
tttagtcggc gttgcagtaa tgggtggaat gtggctgctt gcggaatacg tattaagaa 5160
ggacaaagcc ctcatccttg gtcttgtagc ggggtgcattg tttggctacg tagcagtgat 5220
gtccaaagcc gcggtgaagg gcgaattcca gcacactggc ggccgttact agcttcacgc 5280
tgccgcaagc actcagggcg caagggctgc taaaggaagc ggaacacgta gaaagccagt 5340
ccgcagaaac ggtgctgacc ccggatgaat gtcagctact gggctatctg gacaagggaa 5400
aacgcaagcg caaagagaaa gcaggtagct tgcagtgggc ttacatggcg atagctagac 5460
tgggcggttt tatggacagc aagcgaaccg gaattgccag ctggggcgcc ctctggttaag 5520
gttggaagc cctgcaaagt aaactggatg gctttcttgc cgccaaggat ctgatggcg 5580
aggggatcaa gatctgatca agagacagga tgaggatcgt ttcgcatgat tgaacaagat 5640
ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg gtggagaggc tattcggcta tgactgggca 5700
caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcc gtgttccggc tgtcagcgca ggggcgccc 5760
gttctttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg aactccaaga cgaggcagcg 5820
cggctatcgt ggctggccac gacgggcgtt ccttgccgag ctgtgctcga cgttgctact 5880
gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct cctgtcatct 5940
caccttgctc ctgcccagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg 6000
cttgatccgg ctacctgcc attcgaccac caagcgaaac atcgcatcga gcgagcacgt 6060
actcggatgg aagccggtct tgcgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc 6120
gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgcggatgc ccgacggcga ggatctcgtc 6180
gtgacccatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatgggtg aaaatggccg cttttctgga 6240
ttcatcgact gtggccggct ggggtgtggc gaccgctatc aggacatagc gttggctacc 6300
cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcgt gctttacgg 6360
atcgccgctc ccgattcgca gcgcacgcc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga 6420
gcgggactct ggggttcgct agaggatcga tcctttttta cccatcacat atacctgccg 6480

ttcactatta tttagtga aa tgagatatta tgatatatttc tgaattgtga ttaaaaaggc 6540
aactttatgc ccatgcaaca gaaactataa aaaatacaga gaatgaaaag aaacagatag 6600
atTTTTtagt tctttaggcc cgtagtctgc aaatcctttt atgattttct atcaaacaaa 6660
agaggaaaat agaccagttg caatccaaac gagagtctaa tagaatgagg tcgaaaagta 6720
aatcgcgcgg gtttgttact gataaagcag gcaagacctt aaatgtgtaa agggcaaagt 6780
gtatactttg gcgtcacccc ttacatatatt taggtctttt tttattgtgc gtaactaact 6840
tgccatcttc aaacaggagg gctggaagaa gcagaccgct aacacagtac ataaaaagg 6900
agacatgaac gatgaacatc aaaaagtttg caaaacaagc aacagtatta acctttacta 6960
ccgcactgct ggcaggaggc gcaactcaag cgtttgcgaa agaaacgaac caaaagccat 7020
ataaggaaac atacggcatt tcccatatta cacgccatga tatgctgcaa atccctgaac 7080
agcaaaaaaa tgaaaaatat caagttcctg aatttgattc gtccacaatt aaaaatatct 7140
cttctgcaaa aggctggac gtttgggaca gctggccatt acaaaacgct gacggcactg 7200
tcgcaaacta tcacggctac cacatcgtct ttgcattagc cggagatcct aaaaatgcgg 7260
atgacacatc gatttacatg ttctatcaaa aagtcggcga aacttctatt gacagctgga 7320
aaaacgctgg ccgcgtcttt aaagacagcg acaaattcga tgcaaatgat tctatcctaa 7380
aagaccaaac acaagaatgg tcaggttcag ccacatttac atctgacgga aaaatccgtt 7440
tattctacac tgatttctcc ggtaaacatt acggcaaaca aacactgaca actgcacaag 7500
ttaacgtatc agcatcagac agctctttga acatcaacgg thtagaggat tataaatcaa 7560
tctttgacgg tgacggaaaa acgtatcaaa atgtacagca gttcatcgat gaaggcaact 7620
acagctcagg cgacaacat acgctgagag atcctcacta cgtagaagat aaaggccaca 7680
aatacttagt atttgaagca aacactggaa ctgaagatgg ctaccaaggc gaagaatctt 7740
tatttaacaa agcatactat ggcaaaagca catcattctt ccgtcaagaa agtcaaaaac 7800
ttctgcaaag cgataaaaaa cgcacggctg agttagcaaa cggcgctctc ggtatgattg 7860
agctaaacga tgattacaca ctgaaaaaag tgatgaaacc gctgattgca tctaacacag 7920
taacagatga aattgaacgc gcgaacgtct ttaaaatgaa cggcaaatgg tacctgttca 7980
ctgactcccg cggatcaaaa atgacgattg acggcattac gtctaacgat atttacatgc 8040
ttggttatgt ttctaattct ttaactggcc catacaagcc gctgaacaaa actggccttg 8100
tgttaaaaat ggatcttgat cctaacgatg taacctttac ttactcacac ttcgctgtac 8160
ctcaagcgaa aggaacaat gtcgtgatta caagctatat gacaaacaga ggattctacg 8220
cagacaaaca atcaacgttt gcgccgagct tctgctgaa catcaaaggc aagaaaacat 8280
ctgttgtaaa agacagcatc cttgaacaag gacaattaac agtt 8324

<211> 52
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_23

<400> 23
cccgggatcc gctagcggcg cgccggccgg cccggtgtga aataccgcac ag 52

<210> 24
<211> 53
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_24

<400> 24
tctagactcg agcggccgcg gccggccttt aaattgaaga cgaaagggcc tcg 53

<210> 25
<211> 47
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_25

<400> 25
gagatctaga cccggggatc cgctagcggg ctgctaaagg aagcgga 47

<210> 26
<211> 38
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_26

<400> 26
gagaggcgcg ccgctagcgt gggcgaagaa ctccagca 38

<210> 27
<211> 34
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_27

<400> 27
gagagggcgg ccgcgcaaag tcccgttcg tgaa 34

<210> 28
<211> 34
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SEQ_ID_28

<400> 28

gagagggcgg ccgctcaagt cggtaagcc acgc

34

<210> 29

<211> 140

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SEQ_ID_29

<400> 29

tcgaatttaa atctcgagag gcctgacgtc gggcccggta ccacgcgtca tatgactagt 60

tcggacctag ggatatcgtc gacatcgatg ctcttctgcg ttaattaaca attgggatcc 120

tctagaccgg ggatttaaatt 140

<210> 30

<211> 140

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SEQ_ID_30

<400> 30

gatcatttaa atcccgggtc tagaggatcc caattgttaa ttaacgcaga agagcatcga 60

tgtcgacgat atccctaggt ccgaactagt catatgacgc gtggtaccgg gcccgacgtc 120

aggcctctcg agatttaaatt 140

<210> 31

<211> 5091

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> PCLIK5MCS

<220>

<221> misc_feature

<222> (469)..(1260)

<223> KanR

<220>

<221> misc_feature

<222> (1527)..(2387)

<223> Ori EC pMB (complement)

<220>

<221> misc_feature

<222> (2533)..(3207)

<223> Orf1

<220>

<221> misc_feature

<222> (3541)..(4662)

<223> Rep Protein

<400> 31

tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccgggtac cacgcgtcat atgactagtt 60
cggacctagg gatatcgtcg acatcgatgc tcttctgctg taattaacaa ttgggatcct 120
ctagaccggt gatttaaata gctagcgggc tgctaaagga agcggaaacac gtagaaagcc 180
agtccgcaga aacgggtgctg accccggatg aatgtcagct actgggctat ctggacaagg 240
gaaaacgcaa gcgcaaagag aaagcaggta gcttgacgtg ggcttacatg gcgatagcta 300
gactgggctg ttttatggac agcaagcgaa ccggaattgc cagctggggc gccctctggt 360
aagggtggga agccctgcaa agtaaactgg atggctttct tgccgccaag gatctgatgg 420
cgcaggggat caagatctga tcaagagaca ggatgaggat cgtttcgcac gattgaacaa 480
gatggattgc acgcagggtc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg 540
gcacaacaga caatcggtc ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggctc 600
ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca 660
gcgcggctat cgtggctggc cacgacgggc gttccttgct cagctgtgct cgacgttgct 720
actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcaagtgc cggggcagga tctcctgtca 780
tctcaccttg ctctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat 840
acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca 900
cgtactcgga tggaagccgg tcttgctgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg 960
ctcgcgccag ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgcgca tgcccgacgg cgaggatctc 1020
gtcgtgacct atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaatatgg ccgcttttct 1080
ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct 1140
accggtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttcct cgtgctttac 1200
ggtatcgccg ctcccgattc gcagcgcac gccttctatc gccttcttga cgagttcttc 1260
tgagcgggac tctgggggtc gaaatgaccg accaagcgac gcccaacctg ccatcacgag 1320
atttcgattc caccgccgcc ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcgtt ttccgggacg 1380
ccggctggat gatctccag cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc cacgctagcg 1440
gcgcgccggc cggcccgggtg tgaaataccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcac 1500
aggcgtcttt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga 1560
gcggtatcag ctactcaaaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca 1620
ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg 1680
ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc aaaaaatcg acgctcaagt 1740
cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccccc tggaagctcc 1800

ctcgtgcgct ctctgtttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct 1860
tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc 1920
gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta 1980
tccggtaact atcgtcttga gtccaaccgc gtaagacacg acttatcgcc actggcagca 2040
gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag 2100
tggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag 2160
ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaac caccgctggt 2220
agcggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgc gaaaaaagg atctcaagaa 2280
gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtga acgaaaactc acgttaaggg 2340
attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa ggccggccgc 2400
ggccgcgcaa agtcccgcct cgtgaaaatt ttcgtgccgc gtgattttcc gccaaaaact 2460
ttaacgaacg ttcgttataa tgggtgcatg accttcacga cgaagtacta aaattggccc 2520
gaatcatcag ctatggatct ctctgatgtc gcgctggagt ccgacgcgct cgatgctgcc 2580
gtcgatttaa aaacggtgat cggatttttc cgagctctcg atacgacgga cgcgccagca 2640
tcacgagact gggccagtgc cgcgagcgac ctagaaactc tcgtggcgga tcttgaggag 2700
ctggctgacg agctgcgtgc tcggccagcg ccaggaggac gcacagtagt ggaggatgca 2760
atcagttgcg cctactgcgg tggcctgatt cctccccggc ctgaccgcg aggacggcgc 2820
gcaaaatatt gctcagatgc gtgtcgtgcc gcagccagcc gcgagcgcg caacaaacgc 2880
cacgccgagg agctggaggc ggctaggtcg caaatggcg tggaagtgcg tccccgagc 2940
gaaattttgg ccatggtcgt cacagagctg gaagcggcag cgagaattat cgcgatcgtg 3000
gcggtgcccg caggcatgac aaacatcgta aatgccgcgt ttcgtgtgcc gtggccgccc 3060
aggacgtgtc agcggcgcca ccacctgcac cgaatcggca gcagcgtcgc gcgtcgaaaa 3120
agcgcacagg cggcaagaag cgataagctg cacgaatacc tgaaaaatgt tgaacgcccc 3180
gtgagcggta actcacaggg cgtcggctaa cccccagtcc aaacctggga gaaagcgtc 3240
aaaaatgact ctagcggatt cacgagacat tgacacaccg gcctggaaat tttccgctga 3300
tctgttcgac acccatcccg agctcgcgct gcgatcacgt ggctggacga gcgaagaccg 3360
ccgcgaattc ctgctcacc tgggcagaga aaatttccag ggcagcaaga cccgcgactt 3420
cgccagcgct tggatcaaag acccgacac ggagaaacac agccgaagtt ataccgagtt 3480
ggttcaaaat cgcttgcccg gtgccagtat gttgctctga cgcacgcgc gcacgcagcc 3540
gtgcttgtcc tggacattga tgtgccgagc caccaggccg gcgggaaaat cgagcacgta 3600
aaccgcgagg tctacgcgat tttggagcgc tgggcacgcc tggaaaaagc gccagcttgg 3660
atcggcgtga atccactgag cgggaaatgc cagctcatct ggctcattga tccggtgtat 3720

gccgcagcag gcatgagcag cccgaatatg cgccctgctgg ctgcaacgac cgaggaaatg 3780
 acccgcggtt tcggcgctga ccaggctttt tcacataggc tgagccgtgg ccaactgcact 3840
 ctccgacgat ccagccgta ccgctggcat gccagcaca atcgcggtga tcgcctagct 3900
 gatcttatgg aggttgctcg catgatctca ggcacagaaa aacctaataa acgctatgag 3960
 caggagtttt ctagcggacg ggcacgtatc gaagcggcaa gaaaagccac tgcggaagca 4020
 aaagcacttg ccacgcttga agcaagcctg ccgagcgccg ctgaagcgtc tggagagctg 4080
 atcgacggcg tccgtgtcct ctggactgct ccagggcgctg ccgcccgtga tgagacggct 4140
 ttctgccacg ctttgactgt gggataccag ttaaaagcgg ctggtgagcg cctaaaagac 4200
 accaagggtc atcgagccta cgagcggtgc tacaccgtcg ctcaggcggt cggaggaggc 4260
 cgtgagcctg atctgccgcc ggactgtgac cgccagacgg attggccgcg acgtgtgcg 4320
 ggctacgtcg ctaaaggcca gccagtcgtc cctgctcgtc agacagagac gcagagccag 4380
 ccgaggcgaa aagctctggc cactatggga agacgtggcg gtaaaaaggc cgcagaacgc 4440
 tggaaagacc caaacagtga gtacgccga gcacagcgag aaaaactagc taagtccagt 4500
 caacgacaag ctaggaaagc taaaggaaat cgcttgacca ttgcagggtg gtttatgact 4560
 gttgaggag agactggctc gtggccgaca atcaatgaag ctatgtctga atttagcgtg 4620
 tcacgtcaga ccgtgaatag agcacttaag gtctgcgggc attgaacttc cagaggacg 4680
 ccgaaagctt ccagtaaat gtgccatctc gtaggcagaa aacggttccc ccgtagggtc 4740
 tctctcttgg cctcctttct aggtcgggct gattgctctt gaagctctct aggggggctc 4800
 acaccatagg cagataacgt tccccaccgg ctgcctcgt aagcgcacaa ggactgctcc 4860
 caaagatctt caaagccact gccgcgactg ccttcgcgaa gccttgcccc gcggaattt 4920
 cctccaccga gttcgtgcac acccctatgc caagcttctt tcaccctaaa ttcgagagat 4980
 tggattctta ccgtggaaat tcttcgcaaa aatcgcccc tgatcgccct tgcgacgttg 5040
 gcgtcgggtg cgctgggttg gcttggcttg accgacttga tcagcggccg c 5091

<210> 32
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <223> SEQ_ID_32

<400> 32
 gcgcggtacc tagactcacc ccagtgc

28

<210> 33
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_33

<400> 33
ctctactagt ttagatgtag aactcgatgt

30

<210> 34
<211> 6349
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> PCLIK5MCS

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(177)
<223> PmetA

<220>
<221> misc_feature
<222> (178)..(1311)
<223> metA

<220>
<221> misc_feature
<222> (1727)..(2518)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (2785)..(3645)
<223> Orf1

<220>
<221> misc_feature
<222> (3791)..(4465)
<223> Ori-EC complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (4799)..(5920)
<223> Rep Protein

<400> 34
tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccggtag ctagactcac cccagtgcctt 60
aaagcgctgg gtttttcttt ttcagactcg tgagaatgca aactagacta gacagagctg 120
tccatataca ctggacgaag ttttagtctt gtccaccag aacaggcgggt tattttcatg 180
cccaccctcg cgccttcagg tcaacttgaa atccaagcga tcggtgatgt ctccaccgaa 240
gccggagcaa tcattacaaa cgctgaaatc gcctatcacc gctgggggtga ataccgcgta 300
gataaagaag gacgcagcaa tgtcgttctc atcgaacacg ccctcactgg agattccaac 360
gcagccgatt ggtgggctga cttgctcggg ccgggcaaag ccatcaacac tgatatttac 420
tgcgatgatct gtaccaacgt catcggtggg tgcaacgggt ccaccggacc tggctccatg 480
catccagatg gaaatttctg gggtaatcgc ttccccgcca cgtccattcg tgatcaggta 540

aacgccgaaa aacaattcct cgacgcactc ggcatcacca cggtcgccgc agtacttggt 600
ggttccatgg gtggtgcccg caccctagag tgggccgcaa tgtaccaga aactggtggc 660
gcagctgctg ttcttgcaagt ttctgcacgc gccagcgcct ggcaaatacg cattcaatcc 720
gccccaaatta aggcgattga aaacgaccac cactggcacg aaggcaacta ctacgaatcc 780
ggctgcaacc cagccaccgg actcggcgcc gcccgacgca tcgcccacct cacctaccgt 840
ggcgaactag aaatcgacga acgcttcggc accaaagccc aaaagaacga aaaccactc 900
ggtcacctacc gcaagcccga ccagcgcttc gccgtggaat cctacttgga ctaccaagca 960
gacaagctag tacagcgttt cgacgccggc tcctacgtct tgctcaccga cgccctcaac 1020
cgccacgaca ttggtcgcgga ccgcggaggc ctcaacaagg cactcgaatc catcaaagtt 1080
ccagtccttg tcgcaggcgt agataccgat attttgtacc cctaccacca gcaagaacac 1140
ctctccagaa acctgggaaa tctactggca atggcaaaaa tcgtatcccc tgcgggccac 1200
gatgctttcc tcaccgaaag ccgccaatg gatcgcatcg tgaggaactt cttcagcctc 1260
atctccccag acgaagacaa cccttcgacc tacatcgagt tctacatcta aactagtctc 1320
gacctaggga tatcgtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatcctct 1380
agacccggga tttaaatacg tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag 1440
tccgcagaaa cggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaaggga 1500
aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga 1560
ctgggcggtt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa 1620
ggttgggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg 1680
caggggatca agatctgatc aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga 1740
tggtattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc 1800
acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc 1860
ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc 1920
gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac 1980
tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc 2040
tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac 2100
gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaat catcgcatcg agcgagcacg 2160
tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct 2220
cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt 2280
cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttcttg 2340
attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac 2400
ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg 2460

tatcgccgct cccgattcgc agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg 2520
agcgggactc tgggggtcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat 2580
ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc 2640
ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcca cgctagcggc 2700
gcgccggccg gcccggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag 2760
gcgctcttcc gcttctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc 2820
ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 2880
aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct 2940
ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 3000
gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 3060
cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc 3120
gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg ttaggtcgt 3180
tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttata 3240
cggtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 3300
cactggtaac aggattagca gagcgaggta ttagggcgt gctacagagt tcttgaagtg 3360
gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc 3420
agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 3480
cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga 3540
tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat 3600
tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg ccggccgcgg 3660
ccgcgcaaag tcccgcttcg tgaaaatttt cgtgccgcgt gattttccgc caaaaacttt 3720
aacgaacgtt cgttataatg gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa attggcccga 3780
atcatcagct atggatctct ctgatgtcgc gctggagtcc gacgcgctcg atgctgccgt 3840
cgatttaaaa acggtgatcg gatttttccg agctctcgat acgacggacg cgccagcatc 3900
acgagactgg gccagtgccg cgagcgacct agaaactctc gtggcggatc ttgaggagct 3960
ggctgacgag ctgcgtgctc ggccagcgcc aggaggacgc acagtagtgg aggatgcaat 4020
cagttgcgcc tactgcggtg gcctgattcc tccccggcct gaccgcgag gacggcgcg 4080
aaaatattgc tcagatgcgt gtcgtgccgc agccagccgc gagcgcgcca acaaacgcca 4140
cgccgaggag ctggaggcgg ctaggtcgca aatggcgctg gaagtgcgtc ccccgagcga 4200
aattttggcc atggtcgtca cagagctgga agcggcagcg agaattatcg cgatcgtggc 4260
ggtgcccgcg ggcattgaaa acatcgtaaa tgccgcgttt cgtgtgccgt ggccgcccag 4320
gacgtgtcag cgccgccacc acctgcaccg aatcggcagc agcgtcgcgc gtcgaaaaag 4380

cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaatacctg aaaaatgttg aacgccccgt 4440
gagcggtaac tcacagggcg tcggctaacc cccagtccaa acctgggaga aagcgctcaa 4500
aaatgactct agcggattca cgagacattg acacaccggc ctggaaattt tccgctgata 4560
tgttcgacac ccatcccagag ctgcgcgtgc gatcacgtgg ctggacgagc gaagaccgcc 4620
gcgaattcct cgctcacctg ggcagagaaa atttccaggg cagcaagacc cgcgacttcg 4680
ccagcgcttg gatcaaagac ccggacacgg agaaacacag ccgaagtatt accgagttgg 4740
ttcaaaatcg cttgcccggg gccagtatgt tgctctgacg cacgcgcagc acgcagccgt 4800
gcttgctcctg gacattgatg tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg agcacgtaaa 4860
ccccgaggtc tacgcgattt tggagcgctg ggcacgcctg gaaaaagcgc cagcttggat 4920
cggcgtgaat cactgagcg ggaaatgcc gctcatctgg ctcatgatac cgggtgatgc 4980
cgcagcaggc atgagcagcc cgaatatgcg cctgctggct gcaacgaccg aggaaatgac 5040
ccgcgttttc ggcgctgacc aggttttttc acataggctg agccgtggcc actgcactct 5100
ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggata gcctagctga 5160
tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa cctaaaaaac gctatgagca 5220
ggagttttct agcggacggg cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg cggaagcaaa 5280
agcacttgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgccgct gaagcgtctg gagagctgat 5340
cgacggcgtc cgtgtcctct ggactgctcc agggcgtgcc gcccgatgat agacggcttt 5400
tcgccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggct ggtgagcgcc taaaagacac 5460
caagggatcat cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgct caggcggtcg gaggaggccg 5520
tgagcctgat ctgccgccgg actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac gtgtgcgcgg 5580
ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc agagccagcc 5640
gaggcgaaaa gctctggcca ctatgggaag acgtggcggt aaaaaggccg cagaacgctg 5700
gaaagacca aacagtgagt acgcccagc acagcgagaa aaactagcta agtccagtca 5760
acgacaagct aggaaagcta aaggaaatcg cttgaccatt gcaggttggg ttatgactgt 5820
tgagggagag actggctcgt ggccgacaat caatgaagct atgtctgaat ttagcgtgtc 5880
acgtcagacc gtgaatagag cacttaaggt ctgcgggcat tgaacttcca cgaggacgcc 5940
gaaagcttcc cagtaaatgt gccatctcgt aggcagaaaa cggttcccc gtagggtctc 6000
tctcttgcc tcctttctag gtcgggctga ttgctcttga agctctctag gggggctcac 6060
accataggca gataacgttc ccacccggct cgctcgttaa gcgcacaagg actgctccca 6120
aagatcttca aagccactgc cgcgactgcc ttcgcgaagc cttgccccgc ggaaatttcc 6180
tccaccgagt tcgtgcacac ccctatgcc agcttctttc accctaaatt cgagagattg 6240
gattcttacc gtggaaattc ttcgcaaaaa tcgtcccctg atcgcccttg cgacgttggc 6300

gtcgggtgccg ctggttgccg ttggcttgac cgacttgatc agcggccgc

6349

<210> 35
<211> 29
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_35

<400> 35
gagactcgag agctgccaat tattccggg

29

<210> 36
<211> 41
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_36

<400> 36
cctgaaggcg cgagggtggg catgggtaaa aaatcctttc g

41

<210> 37
<211> 19
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_37

<400> 37
cccaccctcg cgccttcag

19

<210> 38
<211> 18
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_38

<400> 38
ctgggtacat tgcggccc

18

<210> 39
<211> 6386
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> PCLIK5MCS

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(196)
<223> Psod

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (197)..(1330)
 <223> metA

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1752)..(2543)
 <223> KanR

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2810)..(3670)
 <223> Ori-Ec (pMB) complement

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3816)..(4490)
 <223> Orf1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4824)..(5945)
 <223> Rep Protein

<400> 39
 tcgagagctg ccaattattc cgggcttgtg acccgctacc cgataaatag gtcggctgaa 60
 aaatttcggt gcaatatcaa caaaaaggcc tatcattggg aggtgtcgca ccaagtactt 120
 ttgcgaagcg ccatctgacg gattttcāaa agatgtatat gctcgggtgcg gaaacctacg 180
 aaaggatttt ttacccatgc ccaccctcgc gccttcaggt caacttgaaa tccaagcgat 240
 cggatgatgtc tccaccgaag ccggagcaat cattacaaac gctgaaatcg cctatcaccg 300
 ctgggggtgaa taccgcgtag ataaagaagg acgcagcaat gtcgtttctca tcgaacacgc 360
 cctcactgga gattccaacg cagccgattg gtgggctgac ttgctcggtc ccggcaaagc 420
 catcaacact gatatttact gcgtgatctg taccaacgtc atcgggtggtt gcaacggttc 480
 caccggacct ggctccatgc atccagatgg aaattttctgg ggtaatcgct tccccgccac 540
 gtccattcgt gatcaggtaa acgccgaaaa acaattcctc gacgcactcg gcatcaccac 600
 ggtcgccgca gtacttggtg gttccatggg tggtgcccgcc accctagagt gggccgcaat 660
 gtacccagaa actggttggcg cagctgctgt tcttgcaagt tctgcacgcg ccagcgcctg 720
 gcaaatcggc attcaatccg cccaaattaa ggcgattgaa aacgaccacc actggcacga 780
 aggcaactac tacgaatccg gctgcaaccc agccaccgga ctcgggcgccg cccgacgcat 840
 cgcccacctc acctaccgtg gcgaactaga aatcgacgaa cgcttcggca ccaaagccca 900
 aaagaacgaa aaccactcgt gtccctaccg caagcccgac cagcgcttcg ccgtggaatc 960
 ctacttggaac taccaagcag acaagctagt acagcgtttc gacgccgggt cctacgtctt 1020
 gctcaccgac gccctcaacc gccacgacat tggtcgcgac cgcggaggcc tcaacaaggc 1080
 actcgaatcc atcaaagttc cagtccttgt cgcaggcgta gataccgata ttttgtaccc 1140

ctaccaccag caagaacacc tctccagaaa cctgggaaat ctactggcaa tggcaaaaat 1200
cgtatccccct gtcggccacg atgctttcct caccgaaagc cgccaaatgg atcgcatcgt 1260
gaggaacttc ttcagcctca tctccccaga cgaagacaac ccttcgacct acatcgagtt 1320
ctacatctaa catatgacta gttcggacct agggatatcg tcgacatcga tgctcttctg 1380
cgtaaattaa caattgggat cctctagacc cgggatttaa atcgctagcg ggctgctaaa 1440
ggaagcggaa cacgtagaaa gccagtcgcg agaaacgggtg ctgaccccgg atgaatgtca 1500
gctactgggc tatctggaca agggaaaacg caagcgcaaa gagaaagcag gtagcttgca 1560
gtgggcttac atggcgatag ctagactggg cggttttatg gacagcaagc gaaccggaat 1620
tgccagctgg ggcgcctct ggtaagggtg ggaagccctg caaagtaaac tggatggctt 1680
tcttgccgcc aaggatctga tggcgcaggg gatcaagatc tgatcaagag acaggatgag 1740
gatcgtttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc gcttgggtgg 1800
agaggctatt cggctatgac tgggcacaaac agacaatcgg ctgctctgat gccgccgtgt 1860
tccggctgtc agcgcagggg cgcccgggtt tttttgtcaa gaccgacctg tccggtgccc 1920
tgaatgaact gcaggacgag gcagcgcggc tatcgtggct ggccacgacg ggcgttcctt 1980
gcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga ctggctgcta ttgggcgaag 2040
tgccggggca ggatctcctg tcatctcacc ttgctcctgc cgagaaagta tccatcatgg 2100
ctgatgcaat gcggcggctg catacgcttg atccggctac ctgcccattc gaccaccaag 2160
cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc cggctcttgc gatcaggatg 2220
atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact gttcgccagg ctcaaggcgc 2280
gcatgcccga cggcgaggat ctcgctcgtga cccatggcga tgccctgctt cgaatatca 2340
tggtggaaaa tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg ccggctgggt gtggcggacc 2400
gctatcagga catagcgttg gctaccctg atattgctga agagcttggc ggcgaatggg 2460
ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg ccgctcccga ttcgcagcgc atcgcttct 2520
atcgcttct tgacgagttc ttctgagcgg gactctgggg ttcgaaatga ccgaccaagc 2580
gacgccaac ctgceatcac gagatttcga ttccaccgcc gccttctatg aaagggtggg 2640
cttcggaatc gttttccggg acgcggctg gatgacctc cagcgcgggg atctcatgct 2700
ggagttcttc gccacgcta gcggcgcgcc ggccggcccg gtgtgaaata ccgcacagat 2760
gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgct ctccgcttc ctgctcact gactcgtgc 2820
gctcggctcg tggctgcgg cgagcgggtat cagctcactc aaaggcggtg atacggttat 2880
ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca 2940
ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgccc cctgacgagc 3000
atcacaaaaa tcgacgtca agtcagaggt ggcgaaacc gacaggacta taaagatacc 3060

aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg 3120
gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta 3180
ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg 3240
ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggtg actatcgtct tgagtccaac ccggttaagac 3300
acgacttata gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag 3360
gcggtgctac agagtctctg aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat 3420
ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggg agctcttgat 3480
ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcgggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc 3540
gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacgggggtct gacgctcagt 3600
ggaacgaaaa ctacggttaa gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct 3660
agatcctttt aaaggccggc cgcggccgcg caaagtcccg cttcgtgaaa attttcgtgc 3720
cgcgtgattt tccgcaaaaa actttaacga acgttcgtta taatgggtgtc atgaccttca 3780
cgacgaagta ctaaaattgg cccgaatcat cagctatgga tctctctgat gtcgcgctgg 3840
agtccgacgc gctcgatgct gccgtcgatt taaaaacggt gatcggattt ttccgagctc 3900
tcgatacgac ggacgcgcca gcatcacgag actgggccag tgccgcgagc gacctagaaa 3960
ctctcgtggc ggatcttgag gagctggctg acgagctgcg tgctcggcca gcgccaggag 4020
gacgcacagt agtggaggat gcaatcagtt gcgcctactg cgggtggcctg attcctcccc 4080
ggcctgacct gcgaggacgg cgcgcaaaat attgctcaga tgctgtctgt gccgcagcca 4140
gccgcgagcg cgccaacaaa cgccacgccg aggagctgga ggcggctagg tcgcaaattgg 4200
cgctggaagt gcgtcccccg agcgaaattt tggccatggg cgtcacagag ctggaagcgg 4260
cagcgagaat tatcgcgatc gtggcggtgc ccgcaggcat gacaaacatc gtaaatgccg 4320
cgtttcgtgt gccgtggccg cccaggacgt gtcagcgccg ccaccacctg caccgaatcg 4380
gcagcagcgt cgcgcgtcga aaaagcgcac aggcggcaag aagcgataag ctgcacgaat 4440
acctgaaaaa tgttgaacgc ccgctgagcg gtaactcaca ggcgctcggc taacccccag 4500
tccaaacctg ggagaaagcg ctcaaaaatg actctagcgg attcacgaga cattgacaca 4560
ccggcctgga aattttccgc tgatctgttc gacacccatc ccgagctcgc gctgcgatca 4620
cgtggctgga cgagcgaaga ccgccgcgaa ttctcgtctc acctgggcag agaaaatttc 4680
cagggcagca agaccgcga cttcgccagc gcttgatca aagaccgga cacggagaaa 4740
cacagccgaa gttataccga gttggttcaa aatcgcttgc ccggtgccag tatgttgctc 4800
tgacgcacgc gcagcacgca gccgtgcttg tcctggacat tgatgtgccg agccaccagg 4860
ccggcgggaa aatcgagcac gtaaaccctg aggtctacgc gattttggag cgctgggcac 4920
gcctggaaaa agcgcagcgt tggatcggcg tgaatccact gagcgggaaa tgccagctca 4980

tctggctcat tgatccggtg tatgccgcag caggcatgag cagcccgaat atgcgcctgc 5040
tggctgcaac gaccgaggaa atgaccgcg ttttcggcgc tgaccaggct ttttcacata 5100
ggctgagccg tggccactgc actctccgac gatcccagcc gtaccgctgg catgcccagc 5160
acaatcgcgt ggatcgccta gctgatctta tggaggttgc tcgcatgac tcaggcacag 5220
aaaaacctaa aaaacgctat gagcaggagt tttctagcgg acgggcacgt atcgaagcgg 5280
caagaaaagc cactgcggaa gcaaaagcac ttgccacgct tgaagcaagc ctgccgagcg 5340
ccgctgaagc gtctggagag ctgatcgac gcgtccgtgt cctctggact gctccagggc 5400
gtgccgcccg tgatgagacg gcttttcgcc acgctttgac tgtgggatac cagttaaaag 5460
cggctggtga gcgcctaaaa gacaccaagg gtcatcgagc ctacgagcgt gcctacaccg 5520
tcgctcaggc ggtcggagga ggccgtgagc ctgatctgcc gccggactgt gaccgccaga 5580
cggattggcc gcgacgtgtg cgcggctacg tcgctaaagg ccagccagtc gtccctgctc 5640
gtcagacaga gacgcagagc cagccgaggc gaaaagctct ggccactatg ggaagacgtg 5700
gcggtaaaaa ggccgcagaa cgctggaaag acccaaacag tgagtacgcc cgagcacagc 5760
gagaaaaact agctaagtcc agtcaacgac aagctaggaa agctaaagga aatcgcttga 5820
ccattgcagg ttggtttatg actgttgagg gagagactgg ctcgtaggagc acaatcaatg 5880
aagctatgtc tgaatttagc gtgtcacgtc agaccgtgaa tagagcacct aaggtctgcg 5940
ggcattgaac ttccacgagg acgccgaaag cttcccagta aatgtgccat ctcgtaggca 6000
gaaaacggtt ccccgtagg gtctctctct tggcctcctt tctaggtcgg gctgattgct 6060
cttgaagctc tctagggggg ctcacaccat aggcagataa cgttccccac cggctcgcct 6120
cgtaagcgca caaggactgc tcccaaagat cttcaaagcc actgccgcga ctgccttcgc 6180
gaagccttgc cccgcggaaa tttcctccac cgagttcgtg cacacccta tgccaagctt 6240
ctttcaccct aaattcgaga gattggattc ttaccgtgga aattcttcgc aaaaatcgtc 6300
ccctgatcgc ccttgcgacg ttggcgtcgg tgccgctggg tgcgcttggc ttgaccgact 6360
tgatcagcgg ccgctcgatt taaatc 6386

<210> 40

<211> 1005

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE

<400> 40

atgaacctaa agaaccccga aacgccagac cgtaaccttg ctatggagct ggtgcgagtt 60
acggaagcag ctgcactggc ttctggacgt tgggttggac gtggcatgaa gaatgaaggc 120
gacggtgccg ctgttgacgc catgcgccag ctcataact cagtgacct gaagggcgctc 180

40

gttgttatcg gcgagggcga aaaagacgaa gctccaatgc tgtacaacgg cgaagagggtc 240
 ggaaccggct ttggacctga ggttgatata gcagttgacc cagttgacgg caccaccctg 300
 atggctgagg gtcgccccaa cgcaattttcc attctcgcag ctgcagagcg tggcaccatg 360
 tacgatccat cctccgtctt ctacatgaag aagatcgccg tgggacctga ggccgcaggc 420
 aagatcgaca tcgaagctcc agttgcccac aacatcaacg cgggtggcaaa gtccaaggga 480
 atcaaccctt ccgacgtcac cgttgctcgtg cttgaccgtc ctcgccacat cgaactgata 540
 gcagacattc gtcgtgcagg cgcaaagggt cgtctcatct ccgacggcga cgttgcaggt 600
 gcagttgcag cagctcagga ttccaactcc gtggacatca tgatgggcac cggcggaacc 660
 ccagaaggca tcatactgc gtgcgccatg aagtgcattg gtggcgaaat ccagggcatc 720
 ctggccccaa tgaacgattt cgagcgccag aaggcacacg acgctggtct ggttcttgat 780
 caggttctgc acaccaacga tctggtgagc tccgacaact gctacttcgt ggcaaccggt 840
 gtgaccaacg gtgacatgct ccgtggcggt tcctaccgcg caaacggcgc aaccaccggt 900
 tccctgggta tgcgcgcaaa gtcaggcacc atccgccaca tcgagtctgt ccaccagctg 960
 tccaagctgc aggaatactc cgtgggtgac tacaccaccg cgacc 1005

<210> 41

<211> 335

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 41

Met	Asn	Leu	Lys	Asn	Pro	Glu	Thr	Pro	Asp	Arg	Asn	Leu	Ala	Met	Glu
1				5					10					15	
Leu	Val	Arg	Val	Thr	Glu	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	Ser	Gly	Arg	Trp	Val
			20					25					30		
Gly	Arg	Gly	Met	Lys	Asn	Glu	Gly	Asp	Gly	Ala	Ala	Val	Asp	Ala	Met
		35					40					45			
Arg	Gln	Leu	Ile	Asn	Ser	Val	Thr	Met	Lys	Gly	Val	Val	Val	Ile	Gly
	50					55					60				
Glu	Gly	Glu	Lys	Asp	Glu	Ala	Pro	Met	Leu	Tyr	Asn	Gly	Glu	Glu	Val
65					70					75				80	
Gly	Thr	Gly	Phe	Gly	Pro	Glu	Val	Asp	Ile	Ala	Val	Asp	Pro	Val	Asp
			85					90						95	
Gly	Thr	Thr	Leu	Met	Ala	Glu	Gly	Arg	Pro	Asn	Ala	Ile	Ser	Ile	Leu
			100					105					110		
Ala	Ala	Ala	Glu	Arg	Gly	Thr	Met	Tyr	Asp	Pro	Ser	Ser	Val	Phe	Tyr
		115					120					125			
Met	Lys	Lys	Ile	Ala	Val	Gly	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Lys	Ile	Asp	Ile
130						135					140				
Glu	Ala	Pro	Val	Ala	His	Asn	Ile	Asn	Ala	Val	Ala	Lys	Ser	Lys	Gly

41

145	150	155	160
Ile Asn Pro Ser Asp Val Thr Val Val Val Leu Asp Arg Pro Arg His	165	170	175
Ile Glu Leu Ile Ala Asp Ile Arg Arg Ala Gly Ala Lys Val Arg Leu	180	185	190
Ile Ser Asp Gly Asp Val Ala Gly Ala Val Ala Ala Ala Gln Asp Ser	195	200	205
Asn Ser Val Asp Ile Met Met Gly Thr Gly Gly Thr Pro Glu Gly Ile	210	215	220
Ile Thr Ala Cys Ala Met Lys Cys Met Gly Gly Glu Ile Gln Gly Ile	225	230	240
Leu Ala Pro Met Asn Asp Phe Glu Arg Gln Lys Ala His Asp Ala Gly	245	250	255
Leu Val Leu Asp Gln Val Leu His Thr Asn Asp Leu Val Ser Ser Asp	260	265	270
Asn Cys Tyr Phe Val Ala Thr Gly Val Thr Asn Gly Asp Met Leu Arg	275	280	285
Gly Val Ser Tyr Arg Ala Asn Gly Ala Thr Thr Arg Ser Leu Val Met	290	295	300
Arg Ala Lys Ser Gly Thr Ile Arg His Ile Glu Ser Val His Gln Leu	305	310	315
Ser Lys Leu Gln Glu Tyr Ser Val Val Asp Tyr Thr Thr Ala Thr	325	330	335

<210> 42
<211> 6
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> POTENTIELLE_-10-REGION_1

<400> 42
tgcaat

6

<210> 43
<211> 7
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> POTENTIELLE_-10-REGION_2

<400> 43
tatcatt

7

<210> 44
<211> 7
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> RIBOSOMALE_BINDUNGSSTELLE\SHINE-DALGARNO

<400> 44

gaaagga

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/014337

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/77 C12N9/02 C12N1/21		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MERKAMM MURIEL ET AL: "Cloning of the sodA gene from Corynebacterium melassecola and role of superoxide dismutase in cellular viability" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 183, no. 4, February 2001 (2001-02), pages 1284-1295, XP002320454 ISSN: 0021-9193	1-17,20, 24-35, 49-54
Y	page 1277, right-hand column, paragraph 2; figure 3 page 1292, left-hand column, paragraphs 1,2 -/--	18,19, 21-23, 36-48
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. </div>		
° Special categories of cited documents :		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*&* document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center; font-weight: bold;">8 March 2005</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-weight: bold;">01/04/2005</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Rutz, B</div>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP2004/014337

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>-& DATABASE EMBL 'Online! 7 February 2001 (2001-02-07), "Corynebacterium melassecola peptide methionine sulfoxide reductase A (msrA) and manganese superoxide dismutase (sodA) genes, complete cds." XP002320456 retrieved from EBI accession no. EM_PRO:AF236111 Database accession no. AF236111 -----</p> <p>WO 01/00804 A (BASF AKTIENGESELLSCHAFT) 4 January 2001 (2001-01-04)</p> <p>page 6, line 5 - line 13 page 37, line 1 - page 45, line 9 page 56; table 1</p> <p>-& DATABASE Geneseq 'Online! 30 April 2001 (2001-04-30), "C. glutamicum SRT protein nucleotide sequence SEQ ID NO:15." XP002320457 retrieved from EBI accession no. GSN:AAF70991 Database accession no. AAF70991 -----</p>	18,19, 21-23, 36-48
A	<p>EP 1 108 790 A (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD) 20 June 2001 (2001-06-20) -& DATABASE Geneseq 'Online! 26 September 2001 (2001-09-26), "C glutamicum coding sequence fragment SEQ ID NO: 7069." XP002320458 retrieved from EBI accession no. GSN:AAH68534 Database accession no. AAH68534 -----</p>	
A	<p>DATABASE EMBL 'Online! 2 August 2001 (2001-08-02), "Corynebacterium glutamicum gene for superoxide dismutase, complete cds." XP002320459 retrieved from EBI accession no. EM_PRO:AB055218 Database accession no. AB055218 -----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/014337

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>PATEK M ET AL: "PROMOTERS FROM CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM: CLONING, MOLECULAR ANALYSIS AND SEARCH FOR A CONSENSUS MOTIF" MICROBIOLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, READING, GB, vol. 142, no. 5, 1996, pages 1297-1309, XP008006983 ISSN: 1350-0872 cited in the application</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	
A	<p>REINSCHIED DIETER J ET AL: "Cloning, sequence analysis, expression and inactivation of the Corynebacterium glutamicum pta-ack operon encoding phosphotransacetylase and acetate kinase" MICROBIOLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, READING, GB, vol. 145, no. 2, February 1999 (1999-02), pages 503-513, XP002211213 ISSN: 1350-0872 cited in the application</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	
A	<p>HASSETT DANIEL J ET AL: "Cloning and characterization of the Pseudomonas aeruginosa sodA and sodB genes encoding manganese- and iron-cofactored superoxide dismutase: Demonstration of increased manganese superoxide dismutase activity in alginate-producing bacteria" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 175, no. 23, 1993, pages 7658-7665, XP002320455 ISSN: 0021-9193</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP2004/014337

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0100804	A	04-01-2001	AU 5836900 A	31-01-2001
			BR 0011811 A	18-06-2002
			CA 2380870 A1	04-01-2001
			CN 1451047 A	22-10-2003
			EP 1290178 A2	12-03-2003
			ES 2184658 T1	16-04-2003
			HU 0203340 A2	28-01-2003
			WO 0100804 A2	04-01-2001
			JP 2003525593 T	02-09-2003
			MX PA01012844 A	09-07-2002
			PL 359863 A1	06-09-2004
			SK 18882001 A3	10-09-2002
			TR 200103709 T2	21-08-2002
			US 6822084 B1	23-11-2004
			AU 5421300 A	31-01-2001
			CA 2383865 A1	04-01-2001
			EP 1257649 A2	20-11-2002
			ES 2177475 T1	16-12-2002
			WO 0100843 A2	04-01-2001
			JP 2004534501 T	18-11-2004
			MX PA01013123 A	21-06-2002
			PL 353541 A1	01-12-2003
			SK 18862001 A3	06-11-2002
			TR 200103707 T2	23-09-2002
			AU 5559000 A	31-01-2001
			BR 0011805 A	14-05-2002
			CA 2383875 A1	04-01-2001
			CN 1370235 A	18-09-2002
			CZ 20014659 A3	11-09-2002
			EP 1263963 A2	11-12-2002
			WO 0100844 A2	04-01-2001
			JP 2003517291 T	27-05-2003
			MX PA01012842 A	09-07-2002
			PL 353388 A1	17-11-2003
			SK 18872001 A3	03-12-2002
			TR 200103706 T2	21-10-2002
			US 2004180408 A1	16-09-2004
			AU 5421600 A	31-01-2001
			CA 2380863 A1	04-01-2001
			CZ 20014660 A3	11-09-2002
			EP 1255839 A2	13-11-2002
			ES 2177476 T1	16-12-2002
			ES 2178979 T1	16-01-2003
			WO 0100805 A2	04-01-2001
			JP 2004513603 T	13-05-2004
			MX PA01012845 A	09-07-2002
			PL 359967 A1	06-09-2004
			SK 18912001 A3	08-10-2002
			TR 200103708 T2	21-08-2002
			US 6696561 B1	24-02-2004
EP 1108790	A	20-06-2001	EP 1108790 A2	20-06-2001
			JP 2002191370 A	09-07-2002
			US 2002197605 A1	26-12-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/014337

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/77 C12N9/02 C12N1/21

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MERKAMM MURIEL ET AL: "Cloning of the sodA gene from Corynebacterium melassecola and role of superoxide dismutase in cellular viability" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 183, Nr. 4, Februar 2001 (2001-02), Seiten 1284-1295, XP002320454 ISSN: 0021-9193	1-17, 20, 24-35, 49-54
Y	Seite 1277, rechte Spalte, Absatz 2; Abbildung 3 Seite 1292, linke Spalte, Absätze 1,2 -/--	18, 19, 21-23, 36-48

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

* & * Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. März 2005

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

01/04/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Rutz, B

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>-& DATABASE EMBL 'Online! 7. Februar 2001 (2001-02-07), "Corynebacterium melassecola peptide methionine sulfoxide reductase A (msrA) and manganese superoxide dismutase (sodA) genes, complete cds." XP002320456 gefunden im EBI accession no. EM_PRO:AF236111 Database accession no. AF236111 -----</p>	18,19, 21-23, 36-48
	<p>WO 01/00804 A (BASF AKTIENGESSELLSCHAFT) 4. Januar 2001 (2001-01-04) Seite 6, Zeile 5 - Zeile 13 Seite 37, Zeile 1 - Seite 45, Zeile 9 Seite 56; Tabelle 1 -& DATABASE Geneseq 'Online! 30. April 2001 (2001-04-30), "C. glutamicum SRT protein nucleotide sequence SEQ ID NO:15." XP002320457 gefunden im EBI accession no. GSN:AAF70991 Database accession no. AAF70991 -----</p>	
A	<p>EP 1 108 790 A (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD) 20. Juni 2001 (2001-06-20) -& DATABASE Geneseq 'Online! 26. September 2001 (2001-09-26), "C glutamicum coding sequence fragment SEQ ID NO: 7069." XP002320458 gefunden im EBI accession no. GSN:AAH68534 Database accession no. AAH68534 -----</p>	
A	<p>DATABASE EMBL 'Online! 2. August 2001 (2001-08-02), "Corynebacterium glutamicum gene for superoxide dismutase, complete cds." XP002320459 gefunden im EBI accession no. EM_PRO:AB055218 Database accession no. AB055218 -----</p>	
A	<p>PATEK M ET AL: "PROMOTERS FROM CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM: CLONING, MOLECULAR ANALYSIS AND SEARCH FOR A CONSENSUS MOTIF" MICROBIOLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, READING, GB, Bd. 142, Nr. 5, 1996, Seiten 1297-1309, XP008006983 ISSN: 1350-0872 in der Anmeldung erwähnt -----</p>	

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/014337

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>REINSCHIED DIETER J ET AL: "Cloning, sequence analysis, expression and inactivation of the Corynebacterium glutamicum pta-ack operon encoding phosphotransacetylase and acetate kinase" MICROBIOLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, READING, GB, Bd. 145, Nr. 2, Februar 1999 (1999-02), Seiten 503-513, XP002211213 ISSN: 1350-0872 in der Anmeldung erwähnt</p> <p>-----</p>	
A	<p>HASSETT DANIEL J ET AL: "Cloning and characterization of the Pseudomonas aeruginosa sodA and sodB genes encoding manganese- and iron-cofactored superoxide dismutase: Demonstration of increased manganese superoxide dismutase activity in alginate-producing bacteria" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 175, Nr. 23, 1993, Seiten 7658-7665, XP002320455 ISSN: 0021-9193</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/014337

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0100804	A	04-01-2001	AU	5836900 A	31-01-2001
			BR	0011811 A	18-06-2002
			CA	2380870 A1	04-01-2001
			CN	1451047 A	22-10-2003
			EP	1290178 A2	12-03-2003
			ES	2184658 T1	16-04-2003
			HU	0203340 A2	28-01-2003
			WO	0100804 A2	04-01-2001
			JP	2003525593 T	02-09-2003
			MX	PA01012844 A	09-07-2002
			PL	359863 A1	06-09-2004
			SK	18882001 A3	10-09-2002
			TR	200103709 T2	21-08-2002
			US	6822084 B1	23-11-2004
			AU	5421300 A	31-01-2001
			CA	2383865 A1	04-01-2001
			EP	1257649 A2	20-11-2002
			ES	2177475 T1	16-12-2002
			WO	0100843 A2	04-01-2001
			JP	2004534501 T	18-11-2004
			MX	PA01013123 A	21-06-2002
			PL	353541 A1	01-12-2003
			SK	18862001 A3	06-11-2002
			TR	200103707 T2	23-09-2002
			AU	5559000 A	31-01-2001
			BR	0011805 A	14-05-2002
			CA	2383875 A1	04-01-2001
			CN	1370235 A	18-09-2002
			CZ	20014659 A3	11-09-2002
			EP	1263963 A2	11-12-2002
			WO	0100844 A2	04-01-2001
			JP	2003517291 T	27-05-2003
			MX	PA01012842 A	09-07-2002
			PL	353388 A1	17-11-2003
			SK	18872001 A3	03-12-2002
			TR	200103706 T2	21-10-2002
			US	2004180408 A1	16-09-2004
			AU	5421600 A	31-01-2001
			CA	2380863 A1	04-01-2001
			CZ	20014660 A3	11-09-2002
			EP	1255839 A2	13-11-2002
			ES	2177476 T1	16-12-2002
			ES	2178979 T1	16-01-2003
			WO	0100805 A2	04-01-2001
			JP	2004513603 T	13-05-2004
			MX	PA01012845 A	09-07-2002
			PL	359967 A1	06-09-2004
			SK	18912001 A3	08-10-2002
			TR	200103708 T2	21-08-2002
			US	6696561 B1	24-02-2004
EP 1108790	A	20-06-2001	EP	1108790 A2	20-06-2001
			JP	2002191370 A	09-07-2002
			US	2002197605 A1	26-12-2002